

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS**



**ANÁLISIS METABONÓMICO PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE BIOMARCADORES EN ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

José Luis Izquierdo García

Bajo la dirección de los doctores
Jesús Ruiz-Cabello Osuna
Ignacio Rodríguez Ramírez de Arellano

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-1103-9

©José Luis Izquierdo García, 2011



Análisis Metabonómico para la Identificación de Biomarcadores en Enfermedades Respiratorias

Jose Luis Izquierdo García

Memoria de los trabajos para optar al título de Doctor
en Ciencias Físicas por la Universidad Complutense de
Madrid, dirigidos por los doctores Jesús Ruiz-Cabello
Osuna e Ignacio Rodríguez Ramírez de Arellano.

A Celia, elemento indispensable de mi respiración.

A mis padres, por hacer de mí yo mismo.

Índice general

Índice general.....	vii
Prefacio	xi
Agradecimientos	xiii
1. Antecedentes.....	1
1.1. Introducción.....	2
1.2. Análisis Metabonómico.....	3
1.3. Espectroscopía de RMN	6
Espectroscopía bidimensional	9
Espectroscopía de alta resolución por ángulo mágico	9
1.4. Espectroscopía de Masas	11
1.5. Reconocimiento de Patrones	13
Análisis de componentes principales (PCA).....	13
Mínimos cuadrados parciales (PLS)	15
1.6. Bibliografía	17
2. Metabonomic: interfaz gráfica de R para el análisis metabonómico.	21
2.1. Introducción	22
2.2. Descripción del programa	23
2.3. Lectura de datos espectrales	25
2.4. Procesado de los datos.	29
Exclusión de regiones espectrales	29
Corrección de la línea base.....	29

Desplazamiento de señales	31
Normalización.....	33
2.5. Quimiometría en Metabonomía	34
Análisis de componentes principales	34
Análisis lineal discriminante	35
Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales.....	36
Clasificación por vecinos cercanos	37
Redes neuronales	38
2.6. Conclusiones	39
2.7. Referencias.....	40
3. Aproximación metabonomica para la diagnosis del EPOC en un modelo murino de exposición al tabaco.....	45
3.1. Introducción	46
3.2. Métodos	48
Estudio animal y protocolo experimental	48
Morfometría	49
Adquisición de los datos de RMN	49
Procesado espectral	50
Análisis estadístico.....	51
Análisis discriminante	54
3.3. Resultados	55
Morfometría y niveles de carboxihemoglobina	55
Análisis discriminante	57
3.4. Conclusiones	62
3.5. Referencias.....	65

4.	Análisis metabonómico del condensado de exhalado respiratorio como herramienta diagnóstica del EPOC clínico	69
4.1.	Antecedentes	70
4.2.	Evaluación de señales residuales	73
4.3.	Análisis metabonómico por MS.	77
4.4.	Conclusiones	81
4.5.	Referencias.....	82
5.	Aproximación metabonómica para la evaluación de la sepsis experimental.....	83
5.1.	Introducción.....	84
5.2.	Métodos.....	85
	Preparación del animal y protocolo experimental	85
	Análisis histológicos.....	86
	Análisis espectroscópico por RMN	86
	Procesado espectral	88
	Análisis estadístico y modelado.....	88
5.3.	Resultados.....	90
	Resultados hemodinámicos y lactato en suero	90
	PCA e identificación de biomarcadores	91
	Evaluación diagnóstica mediante PLS-DA.....	102
5.4.	Discusión	103
5.5.	Referencias.....	107
6.	Aproximación metabonómica para la evaluación del daño pulmonar inducido por ventilación mecánica	111
6.1.	Introducción.....	112
6.2.	Métodos.....	113
	Preparación del animal y protocolo experimental	113

Medidas	114
Procesado espectral	114
6.3. Resultados	116
Efectos de la ventilación mecánica.....	116
Resultados histológicos	117
PCA e identificación de biomarcadores.....	119
Evaluación diagnóstica mediante PLS-DA.....	128
Correlación entre la intensidad metabólica y los parámetros de daño pulmonar	128
6.4. Conclusiones	132
6.5. Referencias.....	135
7. Resumen y conclusiones.....	139
Glosario.....	143
Índice de tablas.....	145
Índice de figuras.....	147
Lísta de publicaciones	151
Anexo: Publicaciones	153

Prefacio

"I think physicists are the Peter Pans of the human race. They never grow up and they keep their curiosity."

"Pienso que los físicos son los Peter Pans del género humano. Ellos nunca crecen y nunca pierden su curiosidad."

Isidor Isaac Rabi, Premio Nobel de física por descubrir la RMN.

He querido comenzar la presente Tesis Doctoral con una cita que refleja la idea que yo tengo sobre lo que es ser físico. En mi opinión la carrera de físicas no nos prepara para realizar un trabajo o una profesión, sino que nos equipa de las herramientas necesarias para resolver problemas e intentar buscar las causas de los fenómenos observables. Y ésta ha sido la filosofía que ha instilado este trabajo, intentar averiguar las causas de las enfermedades pulmonares antes incluso de que estas se manifiesten.

En los últimos años éste ha sido un interés primordial en el mundo de la Biomedicina, intentar comprender y anticipar los cambios en el fenotipo de una enfermedad a través del desarrollo de las ciencias "ómicas". La conclusión del proyecto del genoma humano ha permitido realizar el diagnóstico presintomático de múltiples enfermedades y gracias a él, tomar medidas preventivas, como alteraciones en el estilo de vida, evitar la exposición a factores de riesgo, realizar un seguimiento continuo del individuo o realizar intervenciones puntuales, para poder tratar la enfermedad aunque todavía no haya aparecido. Pero este tipo de análisis únicamente nos va a permitir entender las enfermedades de carácter genético, con lo que la investigación biomédica ha seguido descendiendo en la cascada de información (genómica → transcriptómica → proteómica →

metabonómica → fenotipo) con el fin de poder anticiparse a todas las causas de una enfermedad.

Con el objetivo de contribuir a la mejora de las técnicas de diagnóstico de ciertas enfermedades pulmonares, actualmente la mayoría en base a criterios no específicos, se propone la búsqueda de patrones metabólicos específicos a través de técnicas espectroscópicas de alta resolución que permitan la caracterización bioquímica del fenotipo de una determinada enfermedad. De esta forma, la memoria está desarrollada en forma de capítulos autoconclusivos que expondrán el desarrollo de paquetes informáticos que permitan analizar la extensa información espectral del análisis metabonómico, y la aplicación de los análisis metabonómicos en diversos estudios animales y humanos.

El primer capítulo, *Antecedentes*, introduce la situación actual del tema que será abordado en esta tesis, así como las bases de las técnicas utilizadas. El segundo capítulo, *Metabonomic: interfaz gráfica de R para el análisis metabonómico*, abarca el desarrollo del software necesario para los análisis posteriores. El tercer capítulo, *Aproximación metabonómica para la diagnosis del EPOC en un modelo murino de exposición al tabaco*, aplica el análisis metabonómico en un modelo de EPOC en ratón. El cuarto capítulo, *Análisis metabonómico del condensado de exhalado respiratorio como herramienta diagnóstica del EPOC clínico*, amplía el estudio del EPOC a un modelo clínico en humanos. El quinto capítulo, *Aproximación metabonómica para la evaluación de la sepsis experimental*, introduce el análisis metabonómico como herramienta de estudio del daño pulmonar agudo, en este caso por un estado de sepsis, y será completado en el capítulo seis, *Aproximación metabonómica para la evaluación del daño pulmonar inducido por ventilación mecánica*, por un estado de daño pulmonar por ventilación mecánica. Y finalmente, el último capítulo, *Resumen y conclusiones*, da unidad a la presente memoria y establece las conclusiones de la misma, cerrando este trabajo.

Me gustaría finalizar esta introducción señalando la intención continuista de este trabajo, pues hemos abierto muchas vías por las que hay que seguir circulando hasta llegar a destino.

Agradecimientos

La conclusión de una tesis doctoral es un proceso largo y costoso que posiblemente sería imposible llevar a cabo si no se contara con numerosas ayudas, especialmente cuando se trabaja en el filo de un campo multidisciplinar como es el de la física médica. Por este motivo, y a riesgo de dejarme a alguien en el camino, me gustaría agradecer su ayuda a todas las personas implicadas en este trabajo.

En primer lugar, a mi familia por apoyarme durante todos estos años, por aguantarme en los *momentos de irritabilidad* y sobre todo por estar ahí siempre.

A Celia, mi otra mitad, sin la que creo que nada de esto hubiese sido posible.

A mis compañeros de investigación, especialmente a Jesús Ruiz-Cabello, mi director de tesis, por creer en mí para llevar este ambicioso proyecto y convertir el espacio de trabajo en un segundo hogar. A Ignacio Rodríguez, co-director de la tesis, por poner a mi disposición su amplia experiencia en RMN. A Angelos Kyriazis, compañero en la batalla, por las largas conversaciones sin las cuales no habrían fermentado las ideas. Y al resto de compañeros del grupo sin los cuales todo habría sido más difícil.

Al grupo de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario de Getafe, colaboradores de investigación, y en especial a Nicolas Nin por toda su ayuda en los aspectos clínicos de esta investigación.

Al grupo de Neumología de la Fundación Jiménez Díaz, también grupo colaborador, y en especial a Germán Peces-Barba y Laura del Puerto Nevado por compartir toda su experiencia sobre el EPOC.

Al CAI de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Complutense, y en especial a Palmira Villa y David Castejón por estar siempre a mi disposición y ofrecer mucho más que un servicio.

A Elizabeth Want y el departamento de Cirugía y Cáncer del Imperial College de Londres, por poner a mi disposición todos sus medios y conocimientos de espectroscopía de masas

Y finalmente a todos mis amigos que me han rodeado y apoyado durante estos años.

Capítulo 1

Antecedentes

La metabonomía es la ciencia que se encarga de estudiar la respuesta metabólica de un sistema biológico ante un estímulo patosicológico o una modificación genética. Acorde con el desarrollo en los últimos años de las ciencias “ómicas” (genómica, proteómica, transcryptómica, etc.), la metabonomía ha experimentado un auge en el estudio de la huella química única que marca un proceso celular, en campos que van desde el desarrollo agro-alimentario a las aplicaciones biomédicas. Este desarrollo viene emparejado a la evolución de las técnicas espectroscópicas de alta resolución junto a los métodos de reconocimiento de patrones que serán necesarios para poder interpretar la información metabólica contenida en las muestras biológicas. A través de este capítulo explicaremos las fases que componen un análisis metabonómico y expondremos los fundamentos teóricos que sustentan esta ciencia de nueva implantación.

1. Introducción.

El origen del campo de la identificación metabólica puede marcarse a principio de los años 70, cuando el desarrollo de las técnicas de separación cromatográficas permitieron la cuantificación de pequeñas moléculas en biofluidos como la orina [1]. Poco después, la espectroscopia RMN de protón fue usada por vez primera como herramienta analítica en estudios metabólicos, donde un conjunto de compuestos entre los que se encontraban el lactato, la creatina o la alanina. fue detectado en una suspensión de glóbulos rojos [2]. Durante los años 80, el análisis de los numerosos metabolitos detectados en los espectros de resonancia magnética impulsó el desarrollo de nuevas técnicas para clasificar las muestras en función de su estatus biológico [3-5]. De esta forma, el concepto de huella dactilar metabólica nace al aplicar técnicas estadísticas multivariantes en la interpretación de los cada vez más complejos datos espectroscópicos de muestras biológicas. Podemos definir la “metabonómica” como la medida cuantitativa de la respuesta dinámica metabólica de los sistemas vivos ante estímulos patofisiológicos o modificaciones genéticas [6]. En paralelo, una aproximación diferente basada en la obtención del perfil metabólico de muestras biológicas in vitro mediante espectrometría de masas acuñó el término “metabolómica” como el análisis comprensivo y cuantitativo de todos los metabolitos de un sistema vivo [7]. A pesar de las diferencias en los conceptos iniciales, la metodología y filosofía de ambas ciencias son muy similares, convirtiéndolas en disciplinas convergentes muy difíciles de distinguir. Esto ha hecho que los términos “metabolómica” y “metabonómica” sean usados intercambiamente en el mundo científico marcado principalmente por razones históricas.

2. Análisis Metabonómico.

El desarrollo de la mayoría de las enfermedades provoca una alteración en el perfil bioquímico de los tejidos y fluidos biológicos. Las mediciones directas de los metabolitos presentes en dichas muestras biológicas son esenciales para estudiar los procesos biológicos de los estados “sano” y “enfermo” e identificar marcadores de diagnóstico o evolución patológica.

La metabonómica es la ciencia encargada de la detección, identificación y cuantificación de los metabolitos presentes en las muestras biológicas con el fin de encontrar variaciones que puedan ser usadas como patrones discriminantes entre las distintas clases de muestras. En los casos de muestras obtenidas de individuos sanos y afectados por alguna enfermedad, el objetivo del análisis metabonómico es identificar las diferencias entre las dos clases, mediante el análisis de los metabolitos endógenos encontrados en tejidos o fluidos biológicos. Para ello, a través de técnicas espectroscópicas de alta resolución, se obtendrá una matriz de datos metabólicos que contendrá toda la información bioquímica de una muestra biológica. Debido a su complejidad, la interpretación de esta matriz de datos requerirá del uso de herramientas estadísticas multivariantes que destacarán aquellas diferencias que sean realmente significativas entre las clases y por consiguiente biomarcadores del proceso estudiado.

Los datos metabólicos son obtenidos principalmente a través de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía de masas (MS). Si comparamos ambos métodos, MS presenta una mayor sensibilidad en comparación con la espectroscopía de RMN. Además, esta técnica suele llevar acoplada otros métodos de pre-separación de las muestras como cromatografía gaseosa [8, 9], cromatografía líquida [10], electroforesis capilar [11] o movilidad iónica. Así mismo, otros métodos analíticos como la Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR) o la cromatografía líquida de alta resolución, que como herramientas metabonómica presentan la desventaja de proporcionar un nivel de detalle insuficiente para la identificación molecular, pueden acoplarse al MS como métodos de pre-separación [12, 13]. Por el contrario, la RMN por medio de

la espectroscopía de ángulo mágico (HR-MAS) es la única técnica capaz de realizar análisis sobre tejidos intactos. Así mismo, la espectroscopía bidimensional de RMN es muy útil en la identificación de las sustancias bioquímicas a través de la conectividad entre señales.

Como introdujimos anteriormente, los datos espectrales resultan de una enorme complejidad como para ser analizados manualmente. La interpretación de los datos metabonómicos requerirá el uso de una serie de herramientas estadísticas multivariantes supervisadas y no supervisadas. El análisis metabonómico completo presentará diferentes fases (figura 1.1).

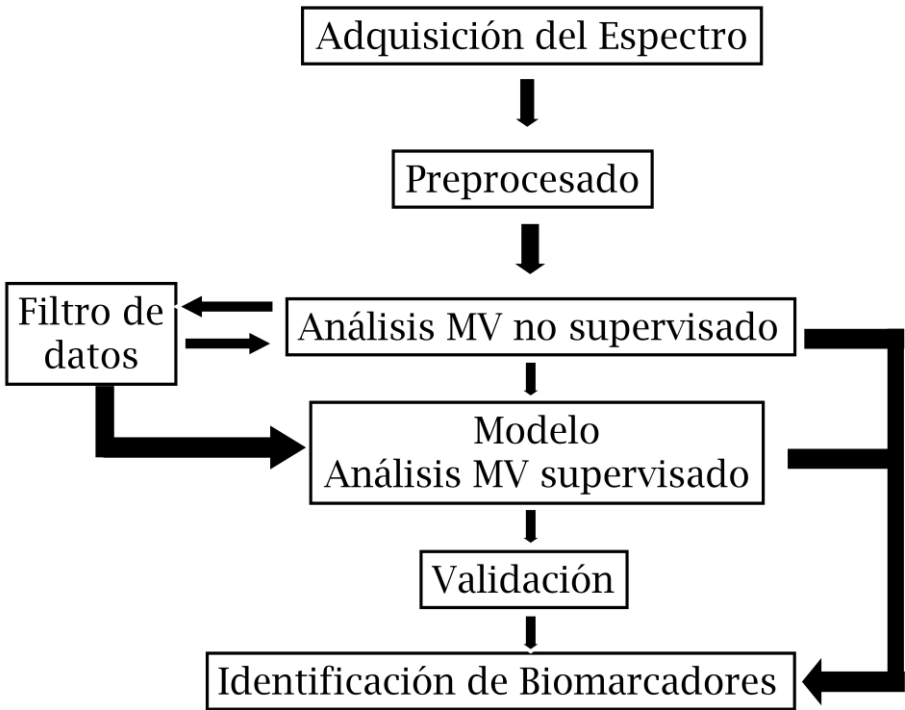


Figura 1.1: Diagrama de flujo del análisis metabonómico.

Tras la adquisición de los espectros por RMN o MS, será necesario realizar un pretratamiento de las señales con el fin de evitar varianzas

propias de la adquisición y hacer los análisis posteriores más robustos. Una vez preprocesados los datos espectrales, podremos comenzar el análisis estadístico. Como primer paso, generalmente se ejecuta un análisis multivariante no supervisado; principalmente un análisis de componentes principales (PCA). El PCA nos destacará las regiones espectrales que están sometidas a una mayor variabilidad (posibles biomarcadores) o que presenten señales no reproducibles (posibles contaminaciones), e identificará las muestras que se diferencian en exceso del conjunto general (posibles “outliers”). El análisis no supervisado nos permitirá filtrar los datos, mejorando su robustez y a través de él podremos identificar los posibles biomarcadores, que serán validados a través de un análisis multivariante supervisado o un modelado posterior.

3. Espectroscopía de RMN.

La Resonancia Magnética Nuclear [14-17] es un fenómeno basado en la existencia de núcleos con momento dipolar magnético no nulo. El momento dipolar magnético, μ , viene dado por: $\mu = \gamma I$, siendo I el momento angular de spin y γ la razón giromagnética. En circunstancias normales, estos momentos no tienen una orientación fija por lo que no hay un campo magnético resultante.

Sin embargo, cuando se localizan los núcleos en un campo magnético externo B_0 los núcleos alinean su momento dipolar magnético en las direcciones dictadas por las leyes de la física cuántica. Tomemos por ejemplo un núcleo con espín $1/2$. Este podrá adoptar dos orientaciones, paralela o antiparalela (figura 1.2).

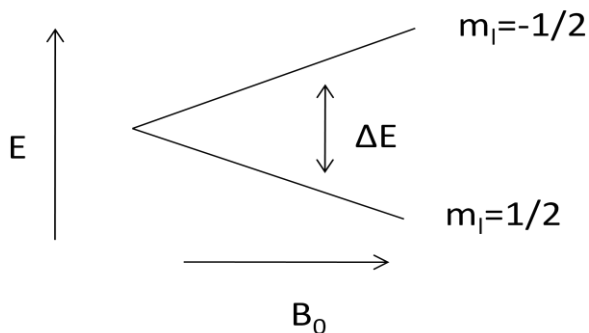


Figura 1.2: Estados de energía del espín nuclear $1/2$.

La mayoría de los núcleos se alinearán de forma paralela al campo debido a su menor energía, donde la diferencia de energía entre estos dos niveles consecutivos viene dada por la ecuación 1.1 y la distribución de niveles por la ley de Boltzmann (ecuación 1.2).

$$\Delta E = h\omega_0 = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (1.1)$$

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (1.2)$$

En términos de la física clásica, cuando el espín se sitúa en un campo magnético "precesa" alrededor de B_0 en un movimiento análogo al de un trompo (figura 3).

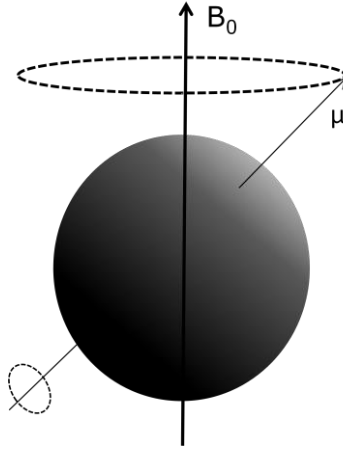


Figura 3: Movimiento de precesión del espín nuclear.

La frecuencia de precesión se corresponde con la frecuencia de Larmor (ecuación 1.3). En caso de equilibrio térmico, la magnetización M y el campo magnético principal B_0 son paralelos. En el caso en que M apunte en una dirección diferente a la de B_0 evoluciona de acuerdo a la ecuación 1.4 que corresponde a un movimiento de precesión de M alrededor del eje creado por B_0 con una velocidad angular $\omega_0 = -\gamma B_0$.

$$\omega_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (1.3)$$

$$\frac{dM}{dt} = M \times \gamma B_0 \quad (1.4)$$

8 Espectroscopía de RMN.

Las descripciones de la física clásica y cuántica son equivalentes, en ambos casos resulta un momento magnético macroscópico o magnetización neta, M_0 , creada por el campo magnético principal que proporciona la base de la señal de RMN. Para detectar esta señal se introduce un segundo campo magnético identificado por B_1 (Pulso de Radiofrecuencia). Este Pulso de Radiofrecuencia, aplicado a la Frecuencia de Larmor, excita los espines nucleares llevándoles al estado superior de energía. Clásicamente esto puede ser representado por una rotación de M alrededor del eje de B_1 , lo que hace que este deje de ser paralelo a B_0 , dependiente del ángulo de inclinación (flip) y de la duración del pulso. Ahora lo que encontraremos será una componente transversal M_T precesando alrededor de B_0 que nos permitirá detectar la señal de resonancia gracias a la ley de inducción de Faraday. Al desconectar el pulso RF obtendremos una señal de resonancia conocida como Señal de Precesión Libre (FID). Durante el periodo de precesión libre la magnetización vuelve a su estado de equilibrio original por un proceso conocido como relajación, que estará caracterizado por dos constantes de tiempo T_1 y T_2 , correspondientes a la relajación longitudinal y transversal, descrito por las ecuaciones de Bloch (ecuación 1.5).

$$\frac{dM}{dt} = M \times \gamma B_0 - \frac{M_x x + M_y y}{T_2} - \frac{(M_z - M_0)z}{T_1} \quad (1.5)$$

La espectroscopía de RMN se basa en que no todos los núcleos de un mismo isótopo resuenan a la misma frecuencia debido a que estos núcleos están rodeados por una nube de electrones diamagnéticos la cual generará un campo magnético local opuesto al campo magnético principal. Esta modificación dependerá de la distribución de electrones alrededor del núcleo y, por tanto, de la estructura química molecular. Esta pequeña modificación de la señal de resonancia de los núcleos se conoce como desplazamiento químico del spin.

Las señales de núcleos individuales pueden mostrar desdoblamiento debido al acoplamiento indirecto espín-espín (J). Para dos núcleos con espín $\frac{1}{2}$ como es el caso de los protones, las líneas de resonancia de cada protón se desdoblarán en un doblete, dos líneas correspondientes a las dos posibles orientaciones del protón adyacente respecto al campo magnético. Extendiendo la cadena de acoplamientos, cada componente de un doblete puede desdoblar, a su vez, en otro

doblete, formando tripletes, dobles dobletes, etc. De esta forma, el acoplamiento J es un parámetro evaluable para la distinción entre isómeros y para las medidas de conformación molecular.

ESPECTROSCOPÍA BIDIMENSIONAL

En la RMN unidimensional una molécula está caracterizada por la amplitud espectral representada en un eje de frecuencias. Este método permite la determinación de la composición de una muestra solamente si no se observan solapamiento de señales en el espectro. Como solución al solapamiento de señales, a mediados de los años 70 se desarrolló un método de espectroscopía de RMN bidimensional [18]. En este caso una serie de espectros unidimensionales son adquiridos bajo la variación de uno de los parámetros de adquisición. En la mayoría de los casos, este parámetro será la duración del tiempo entre dos pulsos. Durante este tiempo, t_1 , el estado de coherencia magnética que fue preparado al principio de la secuencia de pulsos, se encontrará evolucionando. El incremento paso a paso del t_1 permite la monitorización de la evolución del estado preparado del espín. Si por ejemplo la evolución se trata de una precesión de desplazamiento químico, se podrán medir los desplazamientos químicos de los espines involucrados en el estado preparado. Por lo tanto, al final del t_1 , el estado de evolución del espín es transferido a la magnetización de reposo de un segundo espín, seguido por la detección de la señal de RMN durante t_2 . El espectro bidimensional obtenido tras la transformada de Fourier respecto al incremento paso a paso del t_1 y el tiempo de adquisición t_2 dará un mapa bidimensional, donde las señales espectrales serán representadas en función de dos dimensiones de frecuencia. Una señal cruzada en este mapa indicará que durante la secuencia de pulsos se ha producido una transferencia de magnetización entre un par de espines. El análisis de este mapa bidimensional ayudará a identificar los metabolitos presentes en las muestras estudiadas.

ESPECTROSCOPÍA DE ALTA RESOLUCIÓN POR ANGULO MÁGICO

La espectroscopía de RMN de alta resolución por giro de ángulo mágico (HR-MAS) es una técnica que permite la adquisición de espectros de alta resolución de tejidos y células al compensar los mecanismos de ensanchamiento de señal. Como vemos en la ecuación 1.6 el hamiltoniano

del espín depende de las múltiples interacciones del espín con los campos externos y con otros espines internos.

$$H(r) = H_0 + H_{DD}(r) + H_{sus}(r) \quad (1.6)$$

El término $H_0 = -\sum_j \gamma^j B_0 I_z^j$ es la interacción de los espines con el campo externo B_0 , H_{DD} viene del acoplamiento dipolar intramolecular e intermolecular y H_{sus} tendrá en cuenta la susceptibilidad heterogénea al introducir materiales magnéticos en un campo externo, produciendo modificaciones de este tanto dentro como fuera de la materia.

En el tratamiento teórico de muestras líquidas homogéneas, estos efectos se incluyen como pequeñas modificaciones, pero cuando nos encontramos con células o tejidos, ambos términos implican una consideración especial al ser dependientes de la posición de la muestra. El campo magnético local creado por el acoplamiento dipolar y la susceptibilidad heterogenea variará según la posición de la muestra (ecuaciones 1.7 y 1.8), variando también la frecuencia de resonancia.

$$H_{DD} = \sum_{i \neq j} \frac{q_{ij}}{r_{ij}^3} \frac{3\cos^2\theta_{ij} - 1}{2} (3I_{iz}I_{jz} - \vec{I}_i \cdot \vec{I}_j) \quad (1.7)$$

$$H_s = \sum_i \frac{\mu_0}{4\pi r_i^3} (3\cos^2\theta_{ij} - 1) I_{jz} \quad (1.8)$$

donde $q = \mu_0 \gamma_i \gamma_j / 4\pi$ y θ es el ángulo con el campo magnético estático.

Como se observa, ambas ecuaciones son proporcionales a $(3\cos^2\theta_{ij} - 1)$, con lo que si hacemos girar las muestras con un ángulo de 54.7° respecto al campo magnético estático podremos minimizar estas contribuciones, consiguiendo reducir el ensanchamiento de señales de muestras sólidas o semisólidas.

4. Espectroscopía de Masas.

La espectroscopía de masa (MS) [19-21] es una técnica microanalítica que puede ser usada selectivamente para detectar y determinar la cantidad de un determinado analito en una muestra. Esta técnica se basa en identificar las partículas ionizadas en estado gaseoso a través de su relación masa/carga (m/z), la masa del ión dividido por el número de cargas que posee. De esta forma, los espectrómetros de masas, haciendo uso de campos magnéticos o de una combinación de campos eléctricos y magnéticos, podrá modificar la posición de estas partículas, obteniendo un espectro m/z . Normalmente la separación iónica se lleva a cabo mediante cuatro métodos: sector magnético, transformada de Fourier de la resonancia del ciclotrón del ión, cuadrupolo y tiempo de vuelo, siendo estas dos últimas las más utilizadas en aplicaciones metabólicas.

Los espectrómetros de tiempo de vuelo (TOF) miden el tiempo requerido por un ión para viajar desde la fuente de iones al detector. Como todos los iones recibirán la misma energía cinética durante la aceleración, las diferentes velocidades corresponderán a diferentes valores m/z .

Los espectrómetros de cuadrupolo hacen uso de campos eléctricos oscilantes para selectivamente estabilizar o desestabilizar los iones que pasan a través de un campo cuadrupolar de radiofrecuencia creado por cuatro placas paralelas. De esta forma, solamente se permite pasar en un determinado tiempo a los iones con un determinado valor de m/z .

Uno o más de uno de estos analizadores (del mismo o diferente tipo) pueden ser acoplados para crear un tándem de espectrómetros de masas (MS/MS). Estos tándemes proporcionan múltiples posibilidades en el diseño de experimentos. Por ejemplo, uno de los tándemes más comunes es el Q-TOF, donde combinamos un cuadrupolo, que nos permitirá pasar únicamente los iones con un valor de m/z determinado, y un espectrómetro de tiempo de vuelo que analizará los fragmentos de dicho ión.

La sensibilidad y selectividad de la espectroscopía de masas la convierten en una técnica ideal para la detección de metabolitos. No

12 Espectroscopía de Masas.

obstante, el análisis metabonómico requerirá de un fraccionamiento de las muestras previo a la MS. Por lo tanto, cuando hablamos de análisis metabonómico por espectroscopía de masas, realmente nos estamos refiriendo a la combinación de la espectroscopía de masas con técnicas de separación como son la cromatografía de gases o cromatografía líquida (LC), y dentro de esta última, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC).

El uso de HPLC-MS en estudios metabonómicos ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años frente a otras técnicas como la cromatografía gaseosa, al requerir una preparación menos compleja de muestras. Muestras biológicas acuosas como la orina requerirán una mínima preparación. El análisis de muestras más complejas como el plasma requerirá métodos de preparación más exhaustivos para prevenir la degradación de la columna del cromatógrafo. Las muestras retenidas por el HPLC pasarán al espectrómetro ionizadas mediante un electrospray. Dado que algunos analitos ionizarán mejor en modo positivo y otros en modo negativo, un estudio metabonómico completo requerirá el análisis por ambos métodos de ionización. No obstante, la generalización del HPLC-MS para análisis metabonómicos aún guarda una serie de cuestiones por resolver. Uno de los problemas es que no todas las moléculas se ionizarán de la misma manera, provocando diferencias de sensibilidad aún cuando los componentes estén presentes en la misma concentración molar. Esto complica el análisis de muestras complejas como la orina o el plasma, donde no todos los componentes son conocidos. Otro problema surge por la altísima sensibilidad de la MS, donde cada análisis detectará miles de iones no identificados. Mediante un análisis metabonómico por HPLC-MS detectaremos de una forma rápida biomarcadores discriminantes entre las muestras, lo complicado será determinar qué moléculas son estos biomarcadores.

5. Reconocimiento de Patrones.

Los métodos quimiométricos o de reconocimiento de patrones nos permiten extraer la información relevante de la compleja matriz de datos metabólicos. Estos métodos podemos dividirlos en dos vertientes, métodos no-supervisados y métodos supervisados. Los métodos no-supervisados se encargan de reducir la complejidad de una manera robusta, produciendo representaciones gráficas fácilmente interpretables. En los métodos supervisados, un conjunto de muestras de clase conocida son utilizadas para construir y entrenar un modelo matemático que será evaluado con un conjunto independiente de muestras. Entre los métodos no supervisados destaca el Análisis de Componentes Principales (PCA), mientras que entre los supervisados diversas técnicas como el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA), el Análisis Lineal Discriminante (LDA), Redes Neuronales o Análisis por Vecinos Cercanos (KNN) han sido utilizados con éxito en los estudios metabonómicos.

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

PCA es una de las técnicas exploratorias más comunes en el análisis metabonómico [22-24] al poder representar datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad. Los componentes principales son autovectores de la diagonalización de la matriz de covarianza de la matriz de datos original. De esta forma, el primer componente principal consistirá en una combinación lineal de todas las variables espaciales ponderadas para explicar el máximo de la varianza total del espacio original; el segundo componente principal será ortogonal al primero y explicará el máximo de la varianza residual, y así con el resto hasta que la varianza total esté explicada.

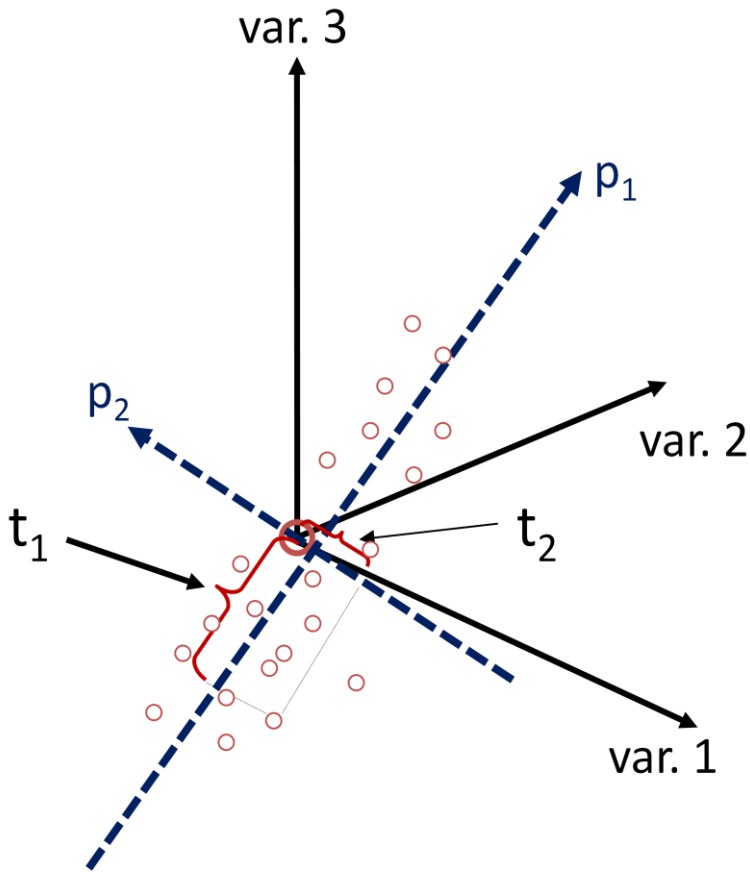


Figura 1.4: Representación de las dos primeras componentes principales en un espacio tridimensional.

Para una matriz de datos X , compuesta por n muestras y d variables, siendo μ_k el valor medio de la variable k , la matriz de covarianza C vendrá descrita por

$$c_{jk} = (n - 1)^{-1} \sum_{i=1}^n (x_{ik} - \mu_k)(x_{ij} - \mu_j) \quad (1.9)$$

La matriz de datos X puede expresarse en función de la matriz de scores T y la matriz de loadings L como

$$X = T \cdot L^t \quad (1.10)$$

Los autovalores y autovectores de la matriz de covarianza se obtienen por diagonalización. Las coordenadas en las gráficas de autovectores se conocen como “scores” y forman la matriz de scores T . Los autovalores, que se conocen como “loadings”, indican la contribución de cada variable en los componentes principales y forman la matriz de loadings L . Normalmente los componentes principales se calculan a través de un algoritmo NIPALS [25].

MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)

El análisis por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) es un método donde una matriz de observables X (datos espectrales) y una matriz de valores cualitativos Y (clase, género, tratamiento de la muestra, etc.) se relacionarán a través de un modelo lineal multivariante [22, 24-26]. La dirección de cada variable latente de la matriz X es modificada para maximizar la covarianza entre ella y la variable latente de la matriz Y .

El método PLS está basado en un modelo bilineal respecto a los objetos y variables de las matrices X e Y , que podrán expresarse

$$X = T \cdot P^t + E \quad (1.11)$$

$$Y = U \cdot Q^t + F = T \cdot Q^t + G \text{ (por relación interna)} \quad (1.12)$$

donde P es la matriz de loadings de X ; Q es la matriz de loadings de Y ; T y U son las matrices de scores; E , F y G son las matrices de los errores residuales.

Los pesos de la matriz X , como las variables X están linealmente combinadas para construir la matriz de scores T , se recogen dentro de la matriz W . De esta forma, las matrices de scores (T y U) contendrán la información sobre las muestras, mostrando las similitudes acorde al modelo, mientras que W y P proporcionarán la información sobre las variables espectrales. La solución al modelo PLS dada por el espacio de variables

latentes también puede ser representado como un modelo de regresión consistente en los coeficientes de regresión PLS, B_{PLS} .

$$Y = X \cdot B_{PLS} + F \quad (1.13)$$

La relación entre los coeficientes de regresión y los pesos vendrá dada por

$$B_{PLS} = W \cdot (P^t \cdot W)^{-1} Q^t \quad (1.14)$$

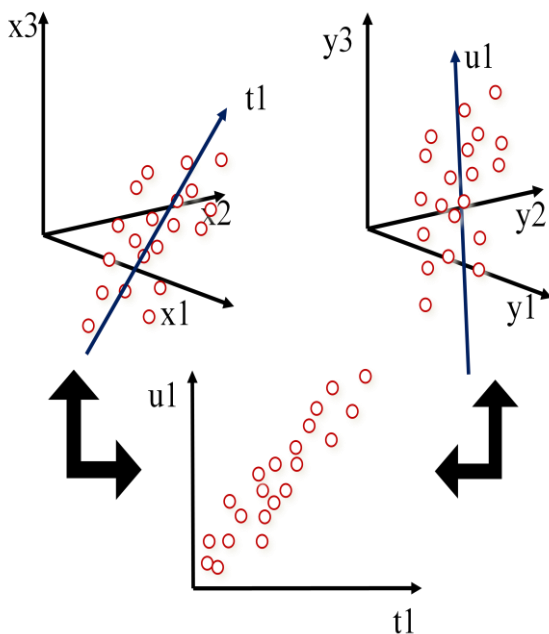


Figura 1.5: Representación de la primera variable latente del modelo PLS componentes elegida para maximizar la correlación entre la matriz X e Y.

Los coeficientes PLS nos permiten simplificar la interpretación de modelos con muchas variables PLS en un único vector, representando la respuesta global de las variables espectrales, pero perdiendo la correlación estructural del modelo.

6. Bibliografía.

1. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68(10): 2374-2376.
2. Brown FF, Campbell ID, Kuchel PW, Rabenstein DC. Human erythrocyte metabolism studies by ¹H spin echo NMR. *FEBS Lett* 1977; 82(1): 12-16.
3. Bales JR, Higham DP, Howe I, Nicholson JK, Sadler PJ. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clin Chem* 1984; 30(3): 426-432.
4. Gartland KP, Sanins SM, Nicholson JK, Sweatman BC, Beddell CR, Lindon JC. Pattern recognition analysis of high resolution ¹H NMR spectra of urine. A nonlinear mapping approach to the classification of toxicological data. *NMR Biomed* 1990; 3(4): 166-172.
5. Nicholson JK, Wilson ID. High-resolution proton magnetic-resonance spectroscopy of biological-fluids. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 1989; 21: 449-501.
6. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29(11): 1181-1189.
7. Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant MolBiol* 2002; 48(1-2): 155-171.
8. Morris M, Watkins SM. Focused metabolomic profiling in the drug development process: advances from lipid profiling. *Curr Opin Chem Biol* 2005; 9(4): 407-412.

18 Bibliografia.

9. Yang J, Xu GW, Zheng YF, Kong HW, Pang T, Lv S, Yang Q. Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases. *J Chromatogr B* 2004; 813(1-2): 59-65.
10. Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, Granger JH, Johnson KA, Smith BW, Plumb RS. High resolution "Ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J Proteome Res* 2005; 4(2): 591-598.
11. Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* 2003; 2(5): 488-494.
12. Gamache PH, Meyer DF, Granger MC, Acworth IN. Metabolomic applications of electrochemistry/mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2004; 15(12): 1717-1726.
13. Kaderbhai NN, Broadhurst DI, Ellis DI, Goodacre R, Kell DB. Functional genomics via metabolic footprinting: monitoring metabolite secretion by Escherichia coli tryptophan metabolism mutants using FT-IR and direct injection electrospray mass spectrometry. *Compar Funct Genom* 2003; 4(4): 376-391.
14. Hore PJ. Nuclear magnetic resonance. Oxford University Press, Oxford ; New York, 1995.
15. De Graaf RA. In vivo NMR spectroscopy : principles and techniques. 2nd ed. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2007.
16. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. The handbook of metabonomics and metabolomics. 1st ed. Elsevier, Amsterdam ; Boston, 2007.
17. Robertson DG, Lindon JC. Metabonomics in toxicity assessment. Taylor & Francis, Boca Raton, FL ;, 2005.

18. Aue WP, Bartholdi E, Ernst RR. 2-Dimensional Spectroscopy - Application to Nuclear Magnetic-Resonance. *Journal of Chemical Physics* 1976; 64(5): 2229-2246.

19. Watson JT, Sparkman OD. Introduction to mass spectrometry : instrumentation, applications and strategies for data interpretation. 4th ed. John Wiley & Sons, Chichester, England ; Hoboken, NJ, 2007.

20. Wilson ID. Chromatographic and Electrophoretic Separations Combined with Mass Spectrometry for Metabonomics. *In*: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, eds. The handbook of metabonomics and metabolomics. 1st ed. Elsevier, Amsterdam ; Boston, 2007; pp. 149-170.

21. Harrigan GG, Goodacre R. Metabolic profiling : its role in biomarker discovery and gene function analysis. Kluwer Academic, Boston, Mass., 2003.

22. Trygg J, Lundstedt T. Chemometrics Techniques for Metabonomics. *In*: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, eds. The Handbook of Metabonomics and Metabolomics. Elsevier, 2007.

23. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2001; 39(1): 1-40.

24. Eriksson L, Johansson E. Multi- and Megavariate Data Analysis: Finding and Using Regularities in Metabonomics Data. *In*: Robertson DG, Lindon JC, eds. Metabonomics in toxicity assessment. Taylor & Francis, Boca Raton, FL ;, 2005; pp. xii, 522 p.

25. Otto M. Chemometrics : statistics and computer application in analytical chemistry. Wiley-VCH, Weinheim ; New York, 1999.

26. Brereton RG. Applied chemometrics for scientists. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2007.

Capítulo 2

Metabonomic: interfaz gráfica de R para el análisis metabonómico

El análisis metabonómico de fluidos y tejidos biológicos requiere varias etapas que abarcan desde el preprocesado de los espectros obtenidos por RMN al uso de potentes herramientas de análisis multivariante y reconocimiento de patrones. El paquete “Metabonomic” ha sido desarrollado dentro de la comunidad estadística de código abierto R, y permite llevar a cabo todas las etapas necesarias en un análisis metabonómico completo. Este paquete ofrece las siguientes opciones:

- Preprocesado de espectros unidimensionales de RMN: ajuste de fase, línea base, etc.
- Postprocesado: normalización, reducción de la dimensión de los datos a través de identificación y alineación de picos, “bucketing”, etc.
- Análisis multivariante no supervisado: Análisis de Componentes Principales (PCA).
- Análisis discriminante: Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), Análisis Lineal Discriminante (LDA), Redes Neuronales, etc.

La descripción de este paquete de software fue recogida en el artículo “A novel R-package GUI for the analysis of metabonomic profiles” publicado por la revista BMC Bioinformática (10:363, 2009).

1. Introducción.

El desarrollo en los últimos años de las ciencias “ómicas” y entre ellas la metabonomía [1], ha generado la necesidad de implementar herramientas de análisis cada vez más complejas que permitan manejar la gran dimensión de los datos obtenidos por las técnicas espectrales de alta resolución. De esta forma, el desarrollo del análisis metabonómico evoluciona en paralelo al de las herramientas que permitan interpretar la información metabólica recogida en los datos espectrales.

Generalmente, el estudio metabonómico por RMN engloba procesamiento espectral, pre-procesamiento de la matriz de datos y análisis estadístico de los datos espectrales. Programas comerciales como Amix tool-kits (Bruker BioSpin, Alemania), matNMR[2] o MestReNova (Mestrelab Research, España), están diseñados para ofrecer al usuario las herramientas más comunes de procesamiento espectral. Además, en algunos de estos paquetes se incluyen herramientas estadísticas básicas para un primer análisis de los datos. No obstante, dado la complejidad de los datos espectrales obtenidos por RMN, un estudio metabonómico completo requiere del uso de herramientas quimiométricas más avanzadas que las que nos ofrecen estos paquetes. De esta forma, los paquetes antes mencionados suelen complementarse con programas comerciales de análisis estadístico multivariante como son SIMCA-P (Umetrics, Suecia) y PLS-Toolbox (Eigenvector, EEUU).

El paquete “Metabonomic” surge de la necesidad de crear un programa integral para el análisis metabonómico que incluya todas las rutinas necesarias, desde el pre-procesado de los espectros al análisis estadístico de los datos. Este paquete, desarrollado en la red de código abierto R [3], ofrece un entorno gráfico intuitivo para la realización del análisis metabonómico completo. “Metabonomic”, haciendo uso de las librerías existentes en R, permite la lectura de los espectros originales de RMN e incorpora los métodos de procesamiento espectral más comunes para reducir fuentes de desviación o varianza. Así mismo, “Metabonomic” incorpora las herramientas más habituales para el reconocimiento de patrones, necesarias en la interpretación de los datos metabonómicos.

2. Descripción del programa.

El paquete de R “Metabonomic” ha sido diseñado usando el interfaz R-Tcl/Tk [4]. Este paquete permite el uso de las herramientas de TK, reemplazando el código TCL por código en R. El programa está en continua actualización y se puede acceder a él desde la página web de la Comunidad R [5]. “Metabonomic”, a través de la versión instalada de R, es operativo tanto en entorno Windows como Linux, y posee una serie de dependencias de otras librerías de R (tabla 2.1) que deberán instalarse para que el programa sea totalmente operativo.

	Paquetes de R
Integración Gráfica	tcltk, tcltk2, tkrplot, scatterplot3d
Procesado	PROcess, caMassClass, FTICRMS, clusterSim, waved
Análisis Multivariante	hddplot, MASS, gpls, pls, class, robustbase, relimp, lcens, kopl
Redes Neuronales	nnet, AMORE, neural

Tabla 2.1. Paquetes necesarios para ejecutar el programa “Metabonomic”.

Una vez instalado y cargado el paquete en la consola principal de R a través del comando “>require (Metabonomic)”, podemos acceder al programa escribiendo el comando “>Metabonomic()”. El interfaz gráfico (figura 2.1) del paquete “Metabonomic” incluye una consola de entrada, la cual puede ser usada para ejecutar cualquier aplicación de R, y dos consolas de salida para diferenciar los resultados de los mensajes de error. Así mismo la ventana principal cuenta con una línea de botones con las siguientes funciones: deshacer, rehacer, mostrar la matriz de datos con la que se está trabajando, ejecutar los comandos escritos en la consola de entrada, borrar la consola de entrada, parar la ejecución de cualquier proceso y regresar a la consola principal de R.

24 Descripción del programa.

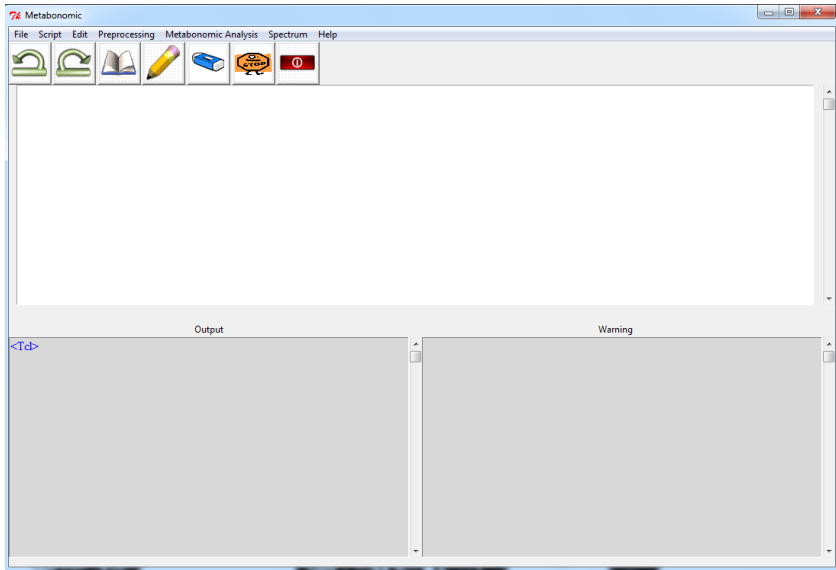


Figura 2.1: Interfaz gráfico del paquete “Metabonomic”.

El interfaz gráfico posee además un menú principal con las siguientes pestañas: “File”, “Script”, “Edit”, “Pre-processing”, “Metabonomic Analysis”, “Spectrum” y “Help”. La pestaña “Script” proporciona acceso a las siguientes funciones: “Load Script” abrirá un script de R previamente guardado, “Save Script” guardará los comandos escritos en la consola de entrada con formato de script de R, y “Launch the Script” ejecutará las líneas de comandos escritas en la consola de entrada. Finalmente a través de la pestaña “Help” podremos acceder a la ayuda del paquete “Metabonomic” alojada en la web de R. El resto de funciones se describirán en detalle en las secciones siguientes.

3. Lectura de datos espectrales.

El programa permite la lectura tanto de espectros en el formato original del espectrómetro, como de espectros ya procesados en formato de archivo de texto. Para la lectura de archivos de texto deberá seleccionarse la pestaña “file/Load Data file”. A través de esta sub-rutina se importará el archivo con los datos espectrales y un archivo con la información y características de las muestras. El archivo que contiene la información espectral debe tener formato de archivo de texto, con los desplazamientos químicos (en ppm) en la primera columna y las intensidades espectrales de las diferentes muestras en las siguientes columnas separadas por un tabulador. El archivo de información, también con formato de texto, contendrá el nombre de las muestras en la primera columna, y las diferentes características de las muestras en las siguientes columnas también separadas por tabuladores. En este caso se requiere incluir una cabecera describiendo cada columna. Un ejemplo de los archivos de entrada se muestran en las tablas 2.2 y 2.3

0.04	-0.22736	-0.39391	-1.01543	-0.01179	-0.02688	-0.05742	...
0.08	0.10953	0.01077	0.98699	-0.00683	-0.09777	0.06941	...
0.12	-0.08364	-0.07193	-0.34336	-0.0386	-0.03565	-0.01926	...
0.16	0.16105	0.22741	0.29454	0.0779	0.24298	0.31358	...
0.20	-0.06745	-0.13793	-0.02053	-0.03298	-0.19988	-0.0597	...
0.24	-0.11715	0.04343	-1.02194	0.0188	-0.1637	0.01647	...
0.28	0.01602	-0.02659	0.05179	-0.07003	0.12988	-0.03622	...
0.32	-0.17843	-0.14788	0.02792	-0.09742	0.03005	0.03134	...
0.36	-0.04896	-0.02681	-0.2965	0.04603	-0.06008	-0.11452	...
...

Tabla 2.2: Ejemplo de archivo de datos con la información espectral para ser importado por el programa “Metabonomic”. La primera columna contiene la posición de desplazamiento químico de cada punto del espectro. Las siguientes columnas contendrán la intensidad espectral de cada una de las muestras analizadas.

Nombre	Categoría	Enfermedad	Genero	Edad
RF03	Enfermo	EPOC	Masculino	50-60
RF08	Enfermo	EPOC	Masculino	60-70
RF10	Enfermo	EPOC	Masculino	50-60
RF17	Enfermo	EPOC	Femenino	60-70
RF20	Enfermo	EPOC	Masculino	60-70
RF27	Enfermo	EPOC	Femenino	50-60
RF30	Enfermo	Asma	Femenino	50-60
RF31	Enfermo	Asma	Masculino	50-60
RF32	Enfermo	Asma	Masculino	60-70
RF33	Enfermo	Asma	Femenino	60-70
RF47	Enfermo	Asma	Femenino	50-60
RF21	Control	Control	Femenino	50-60
RF28	Control	Control	Masculino	50-60
RF43	Control	Control	Femenino	50-60
RF44	Control	Control	Femenino	50-60
RF45	Control	Control	Masculino	60-70
RF52	Control	Control	Masculino	60-70
RF53	Control	Control	Femenino	60-70
RF54	Control	Control	Femenino	50-60

Tabla 2.3: Ejemplo de archivo de información para ser importado por el programa “Metabonomic”. La primera columna contiene el nombre de la muestra y las siguientes columnas las diferentes características que se quieran incluir en el análisis metabonómico.

Como hemos mencionado anteriormente, otra alternativa es cargar directamente los espectros originales en formato Bruker seleccionando “file/Import Bruker file”. En este caso, el usuario debe abrir el archivo “fid” que contendrá la señal oscilante de RMN. La señal oscilante de RMN o decaimiento libre inducido (FID) es la fuerza electromotriz inducida por la magnetización nuclear y recogida a través de una bobina de circuito resonante. Los espectrómetros de RMN detectan por separado la componente x e y de esta señal compleja. Para cualquier instante de

tiempo, dos valores son recogidos M_x y M_y ; esta técnica es conocida como detección sensible a la fase (Phase Sensitive Detection) [6]. La señal compleja de la FID se construye como $M_x(t) + iM_y(t)$. Aunque la señal de la FID contiene toda la información relevante acerca de espines nucleares, rara vez se utiliza directamente. Normalmente los datos en el dominio del tiempo son convertidos al dominio de la frecuencia mediante una transformada de Fourier [7]. La parte real de este cálculo nos muestra líneas individuales con posiciones en unidades de desplazamiento químico, una unidad común para todos los imanes, independientemente de la intensidad de su campo magnético. Sin embargo, si la magnetización se encuentra en el plano xy, pero no perfectamente alineadas a lo largo del eje x, la parte real de la transformada de Fourier también contendrá una contribución dependiente de la frecuencia de la parte imaginaria de la señal. Esta imperfección puede ser subsanada por un proceso llamado corrección de fase. En la mayoría de los casos, la corrección de fase se lleva a cabo mediante la adición de un parámetro constante o independiente de la frecuencia ("de orden cero") y una dependencia lineal en el parámetro de frecuencia ("primer orden") del espectro.

$$\phi_c = \phi_0 + (\omega_0 - \omega)\phi_1 \quad (2.1)$$

El paquete "Metabonomic", una vez leída la señal de la FID y procesada la transformada de Fourier, desplegará una interfaz gráfica interactiva (figura 2.2) que permitirá una corrección manual de la fase. Así mismo, podremos ajustar el eje de los desplazamientos químicos a una señal de referencia en 0 ppm, generalmente debida al TSP (trimethylsilylpropionic acid) o DSS (dimethylsilapentane sulfonic acid) añadido en la preparación de la muestra.

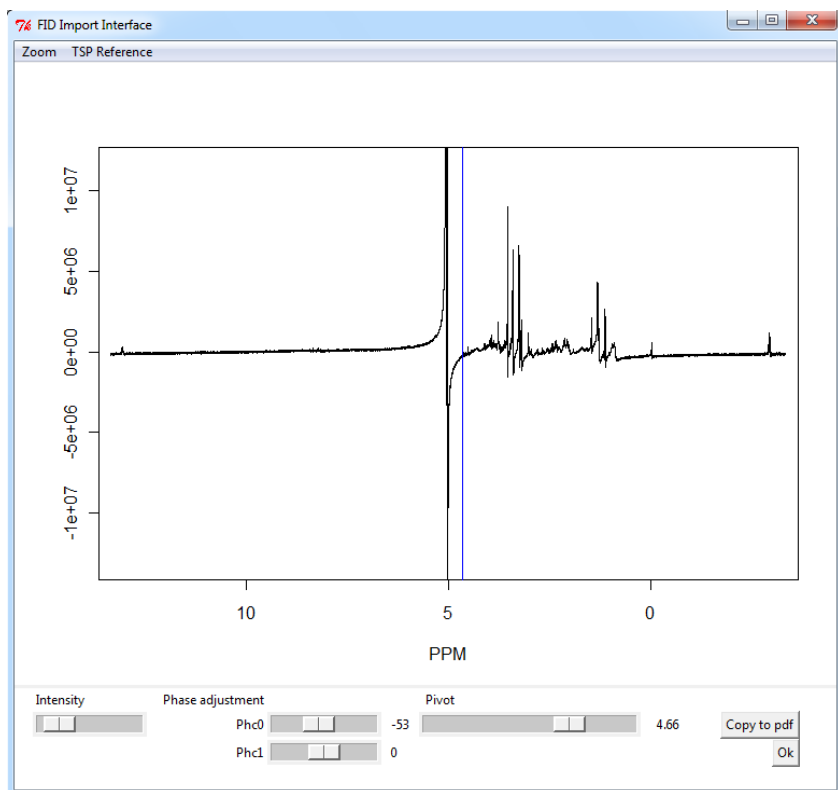


Figura 2.2: Interfaz gráfica interactiva para el ajuste de la fase y referencia del desplazamiento químico a una señal conocida.

Una vez cargados los datos espectrales y la información de las muestras, el usuario deberá elegir qué características de las descritas en el archivo de información desea utilizar para realizar los diferentes análisis estadísticos. Seleccionando la pestaña “file/Category Selection” el usuario elegirá primeramente la característica (cada una de las columnas del archivo de información) que utilizará para clasificar las muestras, y a continuación los subgrupos, en función de la categoría escogida, que participarán en los análisis estadísticos.

4. Procesado de los datos.

El post-procesamiento de los datos espectrales es un paso necesario entre la adquisición de espectros y el análisis estadístico. En los estudios metabonómicos por RMN, los métodos de pre-tratamiento están diseñados para reducir las diferencias y posibles influencias externas que puedan interferir en el análisis de datos.

EXCLUSIÓN DE REGIONES ESPECTRALES

El primer paso generalmente implica la exclusión de las regiones del espectro [8], que, o bien contienen información no reproducible o no contienen información metabólica. Por un lado, la anchura espectral al adquirir los datos de RMN es generalmente mayor que la necesaria para digitalizar todos los desplazamientos químicos asociados con los metabolitos endógenos. Por lo tanto, las regiones espectrales de los extremos, en las que no aparecen señales de ningún metabolitos endógenos son excluidas. Por otra parte, regiones espectrales muy dependientes de los parámetros experimentales, tales como las regiones del agua y de las señales de referencia (TSP) también se excluirán del análisis. Mediante la selección de la pestaña “file/ Manual Cut” ejecutaremos una aplicación gráfica interactiva que nos permitirá seleccionar el área de interés del espectro, así como eliminar señales indeseadas.

CORRECCIÓN DE LA LÍNEA BASE

La corrección de la línea base es un paso esencial en el objetivo de obtener espectros de RMN de alta calidad para el análisis estadístico posterior. Líneas base ondulantes pueden hacer muy difícil el proceso de identificación de picos, así como introducir errores significativos en las medidas cuantitativas de las señales metabólicas.

“Metabonomic” incorpora una herramienta interactiva para la corrección de la línea base espectral (figura 2.3) basada en el paquete FTICRMS de R [9]. Esta aplicación estima la curva de la línea base para cada espectro mediante un modelo de suavizado paramétrico [10]. Esta

herramienta interactiva permite una corrección sencilla e intuitiva de la línea base mediante el ajuste del parámetro de suavizado (“Smoothing Factor”). Otros parámetros optimizados para el análisis de espectros de ^1H RMN, pueden ser modificados a través de la pestaña “Extra Parameters”.

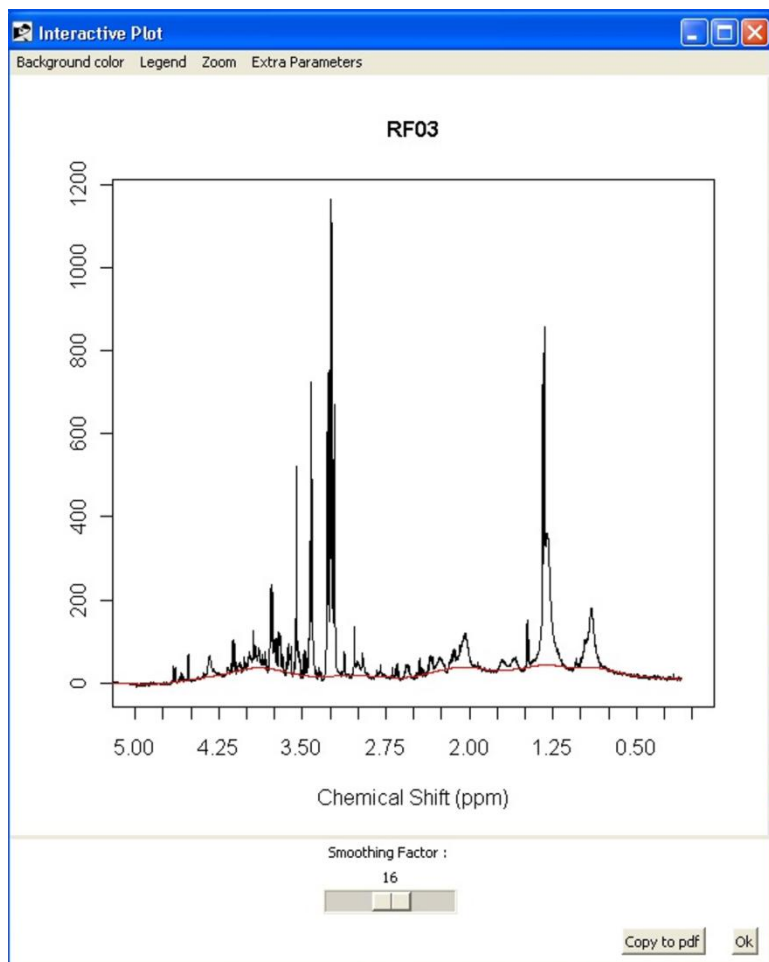


Figura 2.3: Corrección de la línea base del espectro de ^1H RMN mediante el paquete “Metabonomic”

DESPLAZAMIENTO DE SEÑALES

Muchas variables como el pH, la temperatura, la concentración de sales, la concentración relativa de iones específicos, etc., pueden influir en la localización de una determinada señal. Estos cambios no afectan a todos los picos por igual, incluso cuando éstos pertenezcan a un mismo metabolito. Los métodos de análisis multivariante o de reconocimiento de patrones trabajan comparando las variaciones de intensidad entre las muestras para una misma posición del espectro, consecuentemente los resultados de estos análisis se verán fuertemente afectados por pequeños desplazamientos en las posiciones de los picos. Los procedimientos automáticos para corregir esta influencia se pueden dividir en dos categorías: disminución de la resolución espectral (Binning o Bucketing) y la detección y alineamiento de picos (figura 2.4).

En los métodos de Binning [11], el espectro se subdivide en múltiples regiones llamadas “bins” o “buckets” y el área espectral contenida en cada una de esas regiones es integrada a un único valor que se utilizará como representación del espectro original. A través de este procedimiento se mitigarán los errores motivados por pequeños desplazamientos en la posición de los picos. El programa Metabonomic incorpora un método de Binning equidistante de tamaño de “bin” seleccionable.

El alineamiento de picos es una segunda alternativa para corregir los desplazamientos de las señales sin reducir la resolución espectral [12-14]. El paquete “Metabomic” incorpora una herramienta para la identificación de picos basada en la librería caMassClass [15] de R. Ajustando la relación señal-ruido y un umbral mínimo de ruido, la herramienta creará una matriz con la posición y la intensidad de todos los picos detectados en cada espectro. Posteriormente, a través de un algoritmo recurrente, el programa alineará los picos similares de las diferentes muestras. Este algoritmo ponderará la diferencia en la posición espectral y la intensidad de los picos a la hora de identificar la misma señal metabólica en diferentes muestras.

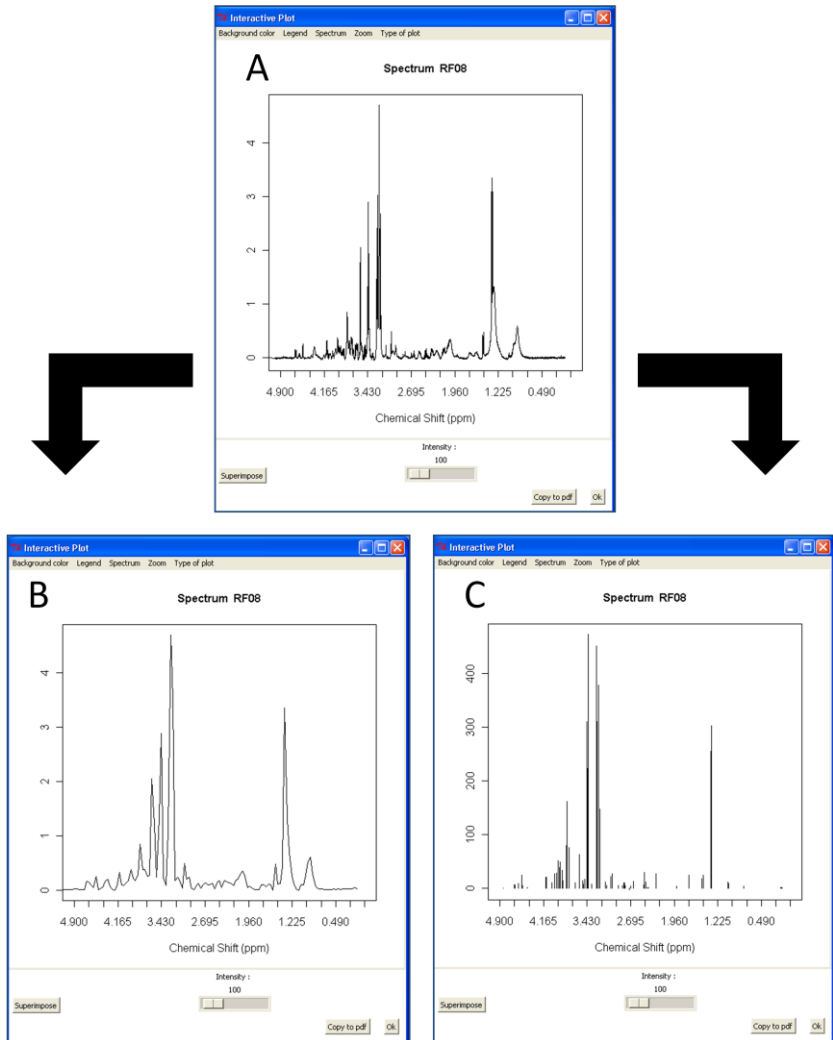


Figura 2.4: Comparación de los dos métodos principales para la corrección del desplazamiento de señales. A) Espectro original de ^1H RMN tras corrección de línea base. B) Espectro integrado en "bins" de 0.04ppm. C) Picos identificados del espectro original

NORMALIZACIÓN

La normalización de los espectros es un paso necesario para controlar las posibles variaciones de la concentración de las muestras analizadas. Así mismo, una normalización de los espectros adquiridos también puede venir motivada por razones técnicas [16]. Si los espectros son almacenados utilizando un diferente numero de adquisiciones (scans) o por dos dispositivos diferentes, los valores absolutos del espectro variarán. Los métodos más comunes de normalización para espectros de RMN [17, 18] son la normalización por el área espectral, especialmente cuando las diferentes muestras contienen aproximadamente el mismo número de metabolitos, y la normalización por el máximo espectral. Así mismo, el paquete “Metabonomic” ofrece otros métodos de normalización menos comunes como normalización por el nivel de ruido o normalización a varianza unidad.

5. Quimiometría en Metabonomía.

Las herramientas de estadística multivariante o de reconocimiento de patrones proporcionan un método adecuado para detectar la información relevante en cuanto a diferencias o similitudes entre perfiles metabólicos [19, 20]. Entre estos métodos, las técnicas más populares son el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el análisis por Mínimo Cuadrados Parciales (PLS). Otros métodos de reconocimiento de patrones menos comunes pero también incluidos en el paquete “Metabonomic” son Análisis Lineal Discriminante (LDA), vecinos cercanos (K-nearest neighbours, KNN) o redes neuronales.

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Como anticipamos en el capítulo 2, PCA es una de las técnicas exploratorias más comunes en el análisis metabonómico por permitir representar los datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad.

El paquete “Metabonomic” incorpora una aplicación gráfica (figura 2.5) para el PCA mediante un algoritmo NIPALS [21] utilizando funciones de las librerías de R “stats” [22] y “robustbase” [23].

A través de esta herramienta podremos previamente centrar y escalar los datos espectrales eligiendo entre Autoescalado (Autoscaling) o escalado Pareto [24]. Además de las gráficas y tablas de “Loadings” y “Scores”, el programa también nos ofrecerá opciones gráficas para testar la robustez del modelo, así como para identificar posibles “outliers”.

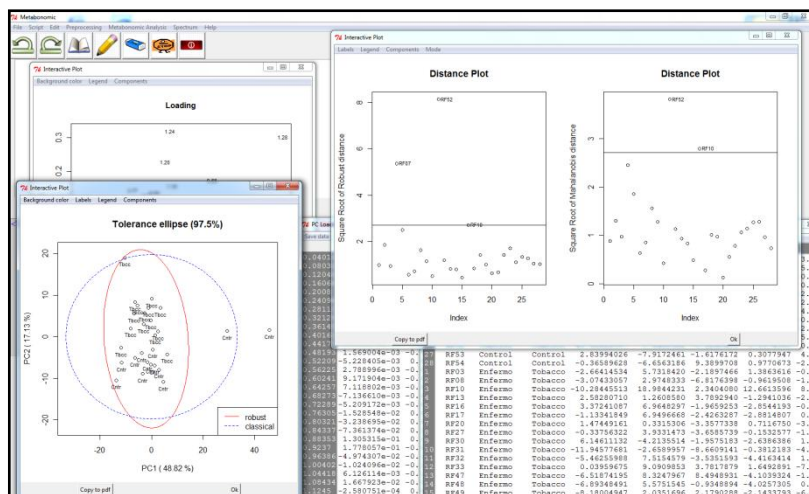


Figura 2.5: Aplicación gráfica interactiva para el Análisis de Componentes Principales

ANÁLISIS LINEAL DISCRIMINANTE

El Análisis Lineal Discriminante (LDA) se trata de otra técnica común en la interpretación de datos metabonómicos [25, 26]. A través del LDA se obtendrán funciones discriminantes, combinaciones lineales de las variables originales seleccionadas para maximizar las diferencias entre los grupos de muestras analizadas. De esta forma, si las muestras analizadas están divididas en dos grupos, la función discriminante será una línea. Si tenemos tres grupos obtendremos un plano y para más de tres clases obtendremos hiperplanos de dimensión $n-1$, siendo n el número de grupos.

El LDA al tratarse de un método estadístico supervisado, donde el usuario proporciona al algoritmo información sobre la clase de cada muestra, es necesario que el modelo construido se valide con uno conjunto externo de muestras con el fin de demostrar su robustez. De esta forma, la herramienta LDA dividirá las muestras en dos subgrupos (seleccionados por el usuario o de forma aleatoria), el primero se utilizará para construir y entrenar el modelo, y el segundo para validar el modelo construido. La herramienta LDA de “Metabonomic” está basada en la librería “MASS” [27]

de R y permite al usuario elegir diferentes algoritmos para construir el modelo: “moment” para una estimación estándar de la media y la varianza, “mle” para una estimación según máxima similitud (“maximum likelihood estimation”) o “t” para una estimación robusta basada en una distribución t.

ANÁLISIS DISCRIMINANTE POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES

El Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) es un método de regresión lineal supervisada basado en la combinación de una matriz de observables (datos espectrales) y una matriz de valores cualitativos. El objetivo del PLS-DA es encontrar variaciones relevantes en la matriz de observables que presenten un máximo de covarianza con el vector de información. PLS-DA proporciona un método gráfico de fácil comprensión para identificar las regiones espectrales que marcan una separación entre clases, mostrando la bondad de la separación y la significancia estadística del resultado.

El paquete “Metabonomic” nos permite realizar el PLS-DA mediante dos métodos diferentes. El primero (Metabonomic Analysis/Partial Least Squares / PLS) ha sido desarrollado basándose en la extensión del algoritmo general PLS propuesta por Ding and Gentleman [28] y permite un análisis discriminante sencillo entre dos clases de muestras dando como resultado el test de validación. El segundo método (Metabonomic Analysis / Partial Least Squares / PLS with graphics) está basado en el paquete “pls” [29] de R y permite la utilización de cuatro algoritmos diferentes: kernel [30], wide kernel [31], SIMPLS [32] y “classic orthogonal scores” [33]. Además de los resultados de validación, esta aplicación nos dará información sobre la robustez del modelo, varianza explicada, R^2 , error estándar de predicción (SEP) y raíz media del error estándar de predicción (RMSEP). Un ejemplo del interfaz gráfico PLS se muestra en la figura 2.6.

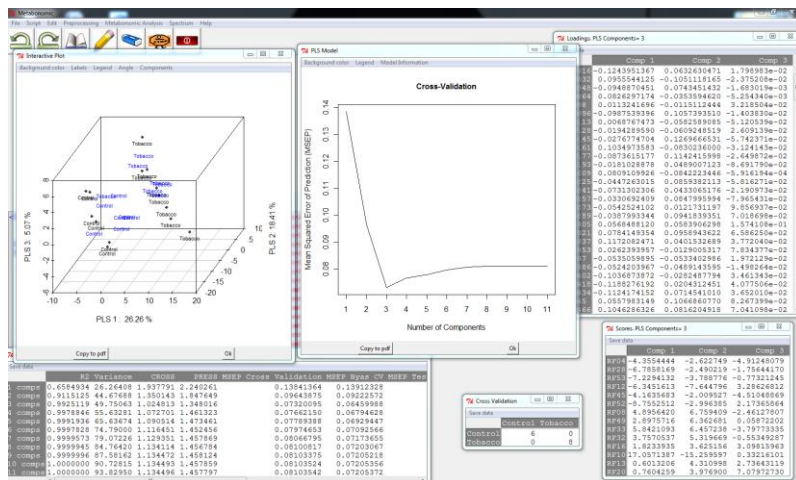


Figura 2.6: Aplicación gráfica interactiva para el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales

El método de Proyecciones Ortogonales a Estructuras Latentes (Orthogonal Projections to Latent Structures, OPLS) se trata de una modificación del método PLS basado en la separación sistémica de los datos metabonómicos en dos componentes: una ortogonal y otra linealmente relacionada al vector de clases. Esta separación facilita la interpretación del modelo, ya que la variación entre clases se puede inferir a partir de la componente predictiva y la variación dentro de las clases se puede deducir de los componentes ortogonales [34]. El paquete “Metabonomic” implementa un enfoque Kernel-OPLS (KOPLS) [35] basado en el paquete “kopl” [36] de R, el cual reformula el algoritmo OPLS incorporando las ventajas propias de los métodos “kernel” en el ámbito de las estructuras no lineales de modelado.

CLASIFICACIÓN POR VECINOS CERCANOS

La regla de los vecinos cercanos (k-nearest neighbors, KNN) [37] es uno de los métodos supervisados más básicos para la clasificación de muestras. Para calificar un objeto de clase desconocida se computa la distancia (generalmente Euclídea) al resto de los objetos. La clase del objeto

a una distancia más corta es seleccionada asignando esa misma clase al objeto desconocido. Al igual que en el resto de métodos supervisados, primeramente se construirá el modelo con una parte de las muestras, seleccionadas por el usuario o de manera aleatoria. En este caso, el usuario deberá seleccionar el número de vecinos y el voto mínimo para tomar una decisión. Finalmente el modelo será validado con el resto de muestras.

REDES NEURONALES

La aplicación de redes neuronales artificiales (RNA) para el procesamiento de datos está caracterizada por una analogía con la neurona biológica. Una RNA está formada por una red de capas de nodos, en cada uno de los cuales se realiza una operación sencilla con varias entradas para producir una única salida. Dos aplicaciones diferentes para construir RNAs han sido incorporadas al paquete “Metabonomic”. La primera aplicación (Metabonomic Analysis / Neural Network / Neural Network [Single hidden layer]) está basada en el paquete “nnet” [27] de R y permite la construcción de una red neuronal de única capa oculta (“single-hidden-layer”), seleccionando el número de neuronas en la capa oculta, el peso inicial y el peso de decaimiento.

La segunda aplicación (Metabonomic Analysis / Neural Network / Neural Network [multiple hidden layers]) construye una RNA proalimentada (Feedforward) acorde a la estructura que establece el paquete “AMORE” [38] de R. Esta segunda aplicación da al usuario mucho más control sobre los parámetros para construir la RNA: el número de capas, el número de neurona en cada capa, el criterio de error, la función de activación de las capas ocultas y de salida, el método de entrenamiento, etc.

6. Conclusiones.

El análisis e interpretación de los perfiles metabólicos es una tarea que requiere de múltiples etapas: procesado de los espectros de RMN, procesado de la matriz espectral, análisis multivariantes no supervisados y finalmente análisis discriminantes supervisados. El paquete “Metabonomic” permite de una forma intuitiva y sencilla, la ejecución en un único programa de todas las etapas que conlleva un análisis metabonómico completo, incluyendo los principales métodos de procesado espectral y las herramientas estadísticas más comunes.

Durante el desarrollo de la interfaz gráfica se ha tenido en cuenta su manejo tanto por usuarios noveles, como por usuarios avanzados. De esta forma, el programa podrá ejecutarse con las opciones más habituales predefinidas o ser modificadas por usuarios expertos.

Finalmente queremos destacar la fácil actualización del paquete “Metabonomic” gracias al diseño modular de su interfaz gráfico. Así nuevas herramientas y paquetes de software desarrollados por la comunidad R pueden ser rápidamente incorporados para el análisis metabonómico.

7. Referencias.

1. Nicholson JK, Holmes E, Lindon JC. Metabonomics and Metabolomics Techniques and their Applications in Mammalian Systems. *In*: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, eds. The handbook of metabonomics and metabolomics. 1st ed. Elsevier, Amsterdam ; Boston, 2007; pp. 1-33.
2. Beek Jv. MatNMR. 3.9.59 ed, 2007.
3. R_Development_Core_Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2010.
4. Dalgaard P. A Primer on the R-Tcl/Tk Package. *R news* 2001: 1(3): 27-31.
5. The Comprehensive R Archive Network. [cited 2010; Available from: <http://cran.r-project.org/>
6. De Graaf RA. In vivo NMR spectroscopy : principles and techniques. 2nd ed. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2007.
7. Bracewell RN. The Fourier transform and its applications. 2nd ed. McGraw-Hill, New York, 1986.
8. Ross A, Schlotterbeck G, Dieterle F, Senn H. NMR Spectroscopy Techniques for Application to Metabonomics. *In*: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, eds. The handbook of metabonomics and metabolomics. 1st ed. Elsevier, Amsterdam ; Boston, 2007; pp. 55-112.
9. Barkauskas D. FTICRMS: Programs for Analyzing Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Data. 1.6 ed, 2007.
10. Xi Y, Rocke DM. Baseline correction for NMR spectroscopic metabolomics data analysis. *BMC Bioinformatics* 2008: 9: 324.

11. Holmes E, Foxall PJD, Nicholson JK, Neild GH, Brown SM, Beddell CR, Sweatman BC, Rahr E, Lindon JC, Spraul M, Neidig P. Automatic Data Reduction and Pattern Recognition Methods for Analysis of ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Human Urine from Normal and Pathological States. *Analytical Biochemistry* 1994; 220(2): 284-296.
12. Wu W, Daszykowski M, Walczak B, Sweatman BC, Connor SC, Haseldeo JN, Crowther DJ, Gill RW, Lutz MW. Peak alignment of urine NMR spectra using fuzzy warping. *J Chem Inf Model* 2006; 46(2): 863-875.
13. Forshed J, Schuppe-Koistinen I, Jacobsson SP. Peak alignment of NMR signals by means of a genetic algorithm. *Anal Chim Acta* 2003; 487(2): 189-199.
14. Veselkov KA, Lindon JC, Ebbels TMD, Crockford D, Volynkin VV, Holmes E, Davies DB, Nicholson JK. Recursive Segment-Wise Peak Alignment of Biological H-1 NMR Spectra for Improved Metabolic Biomarker Recovery. *Anal Chem* 2009; 81(1): 56-66.
15. Tuszynski J. caMassClass: Processing & Classification of Protein Mass Spectra (SELDI) Data. 1.6 ed, 2007.
16. Torgrip R, Åberg K, Alm E, Schuppe-Koistinen I, Lindberg J. A note on normalization of biofluid 1D ¹H-NMR data. *Metabolomics* 2008; 4(2): 114-121.
17. Webb-Robertson B-JM, Lowry DF, Jarman KH, Harbo SJ, Meng QR, Fuciarelli AF, Pounds JG, Lee KM. A Study of spectral integration and normalization in NMR-based metabonomic analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005; 39(3-4): 830-836.
18. Craig A, Cloarec O, Holmes E, Nicholson JK, Lindon JC. Scaling and Normalization Effects in NMR Spectroscopic Metabonomic Data Sets. *Anal Chem* 2006; 78(7): 2262-2267.
19. Winning H, Larsen FH, Bro R, Engelsen SB. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. *J Magn Reson* 2008; 190(1): 26-32.

42 Referencias.

20. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res* 2007; 6(2): 469-479.
21. Otto M. Chemometrics : statistics and computer application in analytical chemistry. Wiley-VCH, Weinheim ; New York, 1999.
22. R_Development_Core_Team. Stats. p. R statistical functions.
23. Filzmoser P., Todorov V., Maechler M. Robustbase: Baic Robust Statistics. 0.2-8 ed, 2007.
24. van den Berg R, Hoefsloot H, Westerhuis J, Smilde A, van der Werf M. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 2006; 7(1): 142.
25. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2001; 39(1): 1-40.
26. Hewer R, Vorster J, Steffens FE, Meyer D. Applying biofluid H-1 NMR-based metabonomic techniques to distinguish between HIV-1 positive/AIDS patients on antiretroviral treatment and HIV-1 negative individuals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; 41(4): 1442-1446.
27. Venables W., Ripley B., Hornik K., Gebhardt A. Bundle of MASS, class, nnet, spatial. 7.2-42 ed, 2008.
28. Ding B, Gentleman R. Classification Using Generalized Partial Least Squares. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 2005; 14(2): 280-298.
29. Ron W, Björn-Helge M. The pls Package: Principal Component and Partial Least Squares Regression in R. *Journal of Statistical Software*: 18(i02).
30. Dayal BS, MacGregor JF. Improved PLS algorithms. *Journal of Chemometrics* 1997; 11(1): 73-85.

31. Rännar S, Lindgren F, Geladi P, Wold S. A PLS kernel algorithm for data sets with many variables and fewer objects. Part 1: Theory and algorithm. *Journal of Chemometrics* 1994; 8(2): 111-125.

32. de Jong S. SIMPLS: An alternative approach to partial least squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1993; 18(3): 251-263.

33. Martens H, Næs T. Multivariate calibration. Wiley, Chichester [England] ; New York, 1989.

34. Trygg J, Wold S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics* 2002; 16(3): 119-128.

35. Rantalainen M, Bylesjo M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. Kernel-based orthogonal projections to latent structures (K-OPLS). *Journal of Chemometrics* 2007; 21(7-9): 376-385.

36. Bylesjo M, Rantalainen M, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. K-OPLS package: kernel-based orthogonal projections to latent structures for prediction and interpretation in feature space. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 106.

37. Fix E, Hodges JL, Jr. Discriminatory Analysis. Nonparametric Discrimination: Consistency Properties. *International Statistical Review / Revue Internationale de Statistique* 1989; 57(3): 238-247.

38. Castejon M, Ordieres J, González A. AMORE: A MORE Flexible Neural Network Package. 0.2-9 ed, 2006.

Capítulo 3

Aproximación metabonómica para la diagnosis del EPOC en un modelo murino de exposición al tabaco

A través de este estudio pionero presentamos una aproximación metabonómica para la evaluación diagnóstica de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) en un modelo murino de exposición al humo del tabaco. Para ello, tejido pulmonar intacto fue examinado a través de RMN de Ángulo Mágico (High-Resolution Magic Angle Spinning, HR-MAS) correspondiente a tres cepas de ratones susceptibles de desarrollar la EPOC y dos cepas resistentes a la enfermedad.

El análisis multivariante de los espectros de ^1H RMN destacó seis desplazamientos químicos, como aquellas señales metabólicas que muestran un alto poder discriminante para las cepas susceptibles entre muestras control y agudamente expuestas al humo del tabaco, y simultáneamente, no se ven alteradas para cepas resistentes. Usando estas señales, un modelo predictivo crónico fue desarrollado y validado con un 100% de éxito en animales enfermos.

Los resultados expuestos en este capítulo fueron recogidos para su publicación en la revista *Metabolomics*, en el artículo titulado “A metabonomic approach to evaluate COPD in a model of cigarette smoke exposure in mice” (6:564–573, 2010).

1. Introducción.

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se caracteriza por una lenta y progresiva limitación de la capacidad respiratoria principalmente causada por el humo del tabaco. El diagnóstico precoz con la suficiente sensibilidad y especificidad de la EPOC es un reto para el mundo clínico. El desarrollo en los últimos años de la Biología Sistémica ha supuesto un impulso en la búsqueda de biomarcadores que puedan servir como indicadores de la progresión de la enfermedad o de la respuesta terapéutica. De esta forma, se ha enfatizado la importancia de los análisis a nivel de expresión de genes (transcriptómica), de proteínas (proteómica) y de la red metabólica (metabonomía).

El análisis de biofluidos mediante espectroscopía de RMN es una herramienta de gran potencial para el entendimiento de los procesos bioquímicos asociados al desarrollo de las enfermedades [1] y en particular, la espectroscopía de RMN por Angulo Mágico (HR-MAS) surge como una excelente opción en el estudio de tejidos intactos [2-4].

El modelo animal presentado en este estudio se basa en que la exposición crónica al humo del tabaco inducirá una remodelación de la matriz proteica extracelular del pulmón [5], conduciendo al desarrollo de enfisema. Así mismo, la exposición aguda al humo también producirá una serie de cambios en la matriz pulmonar apreciables durante las horas siguientes a la exposición al humo del tabaco [6]. No obstante, se ha demostrado que la capacidad para desarrollar enfisema por exposición crónica al humo de tabaco varía según la cepa animal estudiada [7]. De esta forma, una de las razas murinas más susceptibles de desarrollar la EPOC será la cepa AKR/J [8]. Estos ratones presentan un aumento significativo del espacio alveolar, compliancia, respuesta inflamatoria y pérdida de peso tras una exposición prolongada al humo. La cepa C57BL6/J está considerada como moderadamente susceptible [8] al presentar un aumento menos severo del espacio alveolar. Algunos autores [9] han descrito también las diferencias entre cepas murinas tras una exposición aguda al humo del tabaco, caracterizando las cepas C57BL6/J y AKR/J como las más susceptibles en términos de parámetros de inflamación y estrés oxidativo.

Así mismo, también podemos catalogar los ratones Balb/C como altamente susceptible ante una exposición aguda al humo del tabaco, señalada en términos de número de neutrófilos y expresión de la quimiocina KC (homóloga murina de la quimiocina humana GRO- α) encontrados en el fluido del lavado bronqueo-alveolar (BAL) [9]. Por el contrario, la cepa NZWola/Hsd se considera resistente al desarrollo de la EPOC puesto que ha sido probado [8] que estos ratones no desarrollan enfisema después de una exposición prolongada al humo del tabaco. La cepa 129S2/svHsd es también considerada resistente en términos de inflamación pulmonar y estrés oxidativo [10].

El objetivo de este estudio será la identificación de biomarcadores de la fase precoz de la EPOC basados en el perfil metabólico del tejido pulmonar tras una exposición aguda al humo del tabaco. Posteriormente, estos biomarcadores serán usados para construir un modelo diagnóstico del EPOC que será validado por muestras crónicamente expuestas al humo del tabaco.

2. Métodos.

ESTUDIO ANIMAL Y PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El Comité de Investigación Animal de la Fundación Jiménez Díaz-CAPIO aprobó toda la experimentación animal. Un total de 112 animales fueron usados en este estudio (tabla 3.1). En el modelo crónico, ratones AKR/J machos de 3 meses de edad se sometieron al humo del tabaco (n=15) o a una exposición simulada (n=13) durante 6 meses. La exposición crónica consistió en 2 cigarrillos por día (2R1, Universidad de Kentucky) durante 5 días a la semana. El humo era suministrado a través de una bomba peristáltica a una cámara cerrada donde se encontraba el ratón [11].

	Número de muestras (Expuestas/Control)	Desarrollo de EPOC	Exposición
AKR/J	28 (15/13)	Sensible	Crónico
AKR/J	12 (6/6)	Sensible	Agudo
C57bl6/J	24 (12/12)	Sensible	Agudo
Balb/C	24 (12/12)	Sensible	Agudo
NZWola/Hsd	12 (6/6)	Resistente	Agudo
129S2/svHsd	12 (6/6)	Resistente	Agudo

Tabla 3.1: Cepas murinas utilizadas en el estudio.

Niveles de carboxihemoglobina del 10% fueron tomados como marcadores válidos de CO para regular el tiempo de exposición apropiado al humo de tabaco. En el modelo agudo, ratones machos de 3 meses de edad de las cepas AKR/J (susceptible), NZWola/Hsd y 129S2/svHsd (ambas resistentes) se sometieron al humo del tabaco (n=6) o a una exposición simulada (n=6) en una única sesión de 3 cigarros consecutivos. El estudio se complementó con dos cepas susceptibles más, C57bl6/J y Balb/C (n=12 tanto para exposición aguda como control). Las cepas resistentes se incluyeron en el estudio con el fin de excluir los cambios metabólicos producidos por el humo del tabaco que no estén relacionados con el progreso del EPOC. Todos los animales fueron sacrificados 24 horas después

de la exposición. Las muestras fueron recogidas e inmediatamente almacenadas a -80°C hasta el análisis por RMN.

MORFOMETRÍA

Para la cuantificación morfométrica, el pulmón derecho del ratón fue fijado con formalin al 10% (Sigma-Aldrich) a una presión aérea constante de 25 cm de agua durante 24 horas. Secciones de $5\text{ }\mu\text{m}$ de grosor se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las imágenes fueron visualizadas con una videocámara (Leica DC 100; Leica Microsystems; Cambridge, Reino Unido) adaptada a un microscopio (Olympus BX40; Japón) y posteriormente digitalizadas con una resolución de 782×582 pixels. Las imágenes se adquirieron con un objetivo 40x. Mediante el programa de análisis de imágenes estándar del fabricante (Leica Qwin), se midió el Área Interna Alveolar (AIA) y la media horizontal y vertical de las longitudes de la cuerda alveolar (L_M).

ADQUISICIÓN DE LOS DATOS DE RMN

La muestra de tejido pulmonar intacto (aproximadamente 10mg) fue examinado mediante espectroscopía de RMN HR-MAS usando un espectrómetro Bruker AMX500 de 11.7T. Las muestras fueron impregnadas con agua deuterada (D_2O) más TSP a 0.1mM, e introducidas en un rotor de HR-MAS de óxido de circonio, de 4mm de longitud y 50 μl de capacidad cilíndrica. Durante la adquisición, se hizo girar al rotor a 4000Hz con el fin de eliminar del espectro los artefactos de giro. El tiempo de “Shimming” y de preparación de adquisición fueron reducidos al mínimo con el fin de minimizar los cambios metabólicos. Así mismo los análisis se realizaron a 4°C . De esta forma, no se apreció ninguna degradación importante en las señales de los espectros adquiridos con las mismas condiciones durante al menos 4 horas después de la preparación de las muestras.

Los espectros fueron agrupados en 16.000 puntos y promediados sobre 256 adquisiciones. La adquisición de los datos supuso un tiempo aproximado de 13 minutos. Se usó una secuencia basada en el primer incremento de la secuencia de pulsos NOESY, modificada para efectuar la supresión de la señal del agua y limitar el efecto de las inhomogeneidades de B_0 y B_1 en el espectro, (relaxation delay- 90° -t1- 90° -tm- 90° -acquire FID)

en la cual un pulso secundario de radiofrecuencia se aplica sobre la frecuencia de resonancia del agua durante el tiempo de relajación de 2s y el tiempo de mezcla ($t_m=150\text{ms}$), con un t_1 fijo a $3\mu\text{s}$. La anchura espectral fue de 8333.33 Hz. Antes de la transformada de Fourier, las señales del FID fueron multiplicadas por una función exponencial correspondiendo a una anchura lineal de 0.3Hz. Los espectros fueron referenciados al singlete del TSP a 0ppm.

Además de los espectros unidimensionales de protón, para el estudio se realizaron una serie de adquisiciones bidimensionales homonucleares con el fin de facilitar la asignación metabólica. Un protocolo estándar de realce por gradiente COSY fue adquirido bajo las siguientes condiciones: presaturación del agua durante el tiempo de relajación, anchura espectral de 8333Hz en ambas dimensiones, 2.000 puntos en f_2 y 384 incrementos en f_1 . En ambas dimensiones se aplicó una función de ventana sinusoidal sin desplazamiento y sobre la dimensión f_1 se realizó una técnica de relleno con ceros ("zero filling").

^1H - ^1H TOCSY se registró en el modo Tiempo Proporcional al Incremento de Fase sensible a la fase (TPPI phase sensitive), con presaturación de la señal del agua durante el tiempo de relajación de 1s, una anchura espectral de 8333Hz en ambas dimensiones, 70ms de tiempo de mezcla, 2.000 puntos en f_2 y 384 incrementos en f_1 . Se aplicó "Zero filling" sobre f_1 y una función de ventana cuadrada sinusoidal sin desplazamiento en ambas dimensiones.

PROCESADO ESPECTRAL

Dada la baja relación señal-ruido en la región de bajo campo, solamente la parte alifática del espectro de ^1H RMN se incluyó en el estudio. La región del espectro entre 5.00-5.20 ppm fue excluida del análisis con el objetivo de eliminar los artefactos aleatorios originados por la supresión de la señal del agua. De la misma manera, la región entre 0-0.04 ppm también fue excluida del análisis al contener la señal de referencia interna (TSP). La corrección de la línea base fue ejecutada automáticamente con el paquete "Metabonomic". Así mismo, el resto de los análisis descritos a continuación fueron realizados con el mismo paquete. El procesamiento de los espectros

bidimensionales fue ejecutado con el programa MestRenova (Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, España)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Previamente al análisis estadístico, los datos espectrales fueron post-procesados para corregir diferencias entre los espectros en cuanto a intensidad total o desplazamientos en las posiciones químicas de las señales. Por lo tanto, los espectros de RMN fueron normalizados por el área total espectral con el fin de corregir posibles diferencias de concentración entre las muestras de tejido. Los desplazamientos de los picos se corrigieron a través de una identificación y alineación de las señales metabólicas. Los picos potenciales fueron identificados sobre los espectros previamente “suavizados” usando las variaciones locales de los vecinos cercanos, a través de la función K de Ripley [12]. Para esta detección se utilizó la herramienta “Peak Detection” del paquete “Metabonomic” con los siguientes parámetros: signal-noise ratio=2, threshold criterion=0.8, local variance estimation window= 31 y local maxima finding window= 3. Los picos detectados en las diferentes muestras fueron identificados y alineados mediante el algoritmo Peakminer [13] incluido en “Metabonomic”. A través de este post-procesado la matriz de datos original fue reducida a 71 regiones de desplazamiento químico.

Con el objetivo de identificar la información metabólica relacionada con el EPOC, para cada desplazamiento químico, las diferencias entre los grupos control y tratado se calculan por separado para cepas susceptibles y resistentes a través de un análisis estadístico univariante F [14], asignando a los picos un valor F (tabla 3.2) según su poder discriminatorio.

Pico	Susceptible F-value	Resistente F-value			
			2.96	5.51	4.02
			2.97	9.87	0.70
0.96	1.62	0.64	3.00	0.50	0.00
0.97	1.49	0.01	3.04	0.17	1.21
1.00	0.72	2.74	3.12	0.26	0.00
1.04	0.00	0.84	3.22	1.86	0.29
1.33	2.01	0.03	3.24	2.63	1.10
1.34	1.89	0.01	3.26	2.32	0.06
1.47	0.01	0.99	3.28	2.12	0.13
1.49	0.02	1.60	3.35	0.14	1.69
2.04	1.67	0.37	3.40	5.60	0.39
2.06	1.13	0.13	3.41	14.02	0.03
2.07	3.37	0.61	3.42	12.74	0.18
2.09	0.32	0.09	3.44	0.71	0.01
2.13	0.00	0.17	3.45	0.06	0.11
2.14	0.00	0.20	3.47	1.79	0.05
2.15	0.14	0.64	3.49	2.87	0.47
2.27	2.43	0.24	3.51	1.24	0.00
2.37	2.70	0.16	3.53	3.02	2.33
2.41	0.52	0.21	3.55	0.09	0.22
2.44	1.68	1.06	3.56	1.26	0.92
2.46	0.81	0.27	3.58	0.33	0.39
2.57	12.16	1.20	3.60	0.23	0.04
2.58	4.13	1.09	3.62	12.38	0.00
2.65	0.83	1.90	3.63	6.27	0.13
2.80	3.07	0.01	3.64	2.02	0.95
2.81	2.27	0.41	3.68	14.48	0.21
2.83	0.18	1.58			

Tabla 3.2: Resultado de los análisis estadísticos F enfrentando muestras control con muestras tratadas para cepas susceptibles y resistentes al EPOC.

3.71	20.75	0.18	4.10	0.00	1.59
3.73	4.54	0.42	4.11	0.02	1.64
3.76	12.51	0.10	4.13	0.40	0.84
3.77	0.15	0.06	4.14	0.03	2.42
3.78	1.06	1.01	4.33	12.19	0.96
3.84	1.78	3.01	4.52	2.76	0.52
3.86	0.89	0.00	4.53	1.46	0.05
3.94	10.08	0.35	4.64	1.23	0.59
3.98	0.29	1.20	4.66	2.35	1.18

Continuación tabla 3.2: Resultado de los análisis estadísticos F enfrentando muestras control con muestras tratadas para cepas susceptibles y resistentes al EPOC.

Considerando que los cambios metabólicos, y consecuentemente la separación entre grupos control y tratado, en los animales susceptibles de desarrollar EPOC deben estar causados por una combinación de los efectos del tabaco relacionados y no relacionados con la EPOC, mientras que en animales resistentes únicamente estarán causados por los efectos no relacionados con la evolución de la enfermedad, hemos intentado minimizar o suprimir los cambios metabólicos no relacionados con la EPOC a través de una selección cruzada de los metabolitos de ambos análisis F. Un resumen de este análisis se muestra en la figura 3.1. Con este objetivo, del conjunto total de señales, se seleccionaron los desplazamientos químicos que cumplieran un valor F mayor que $F_{\text{crit}}=11.39$ (significancia estadística de 0.001) en las cepas susceptibles y simultáneamente un valor F menor que $F_{\text{crit}}=0.46$ (significancia estadística de 0.5) en las cepas resistentes.

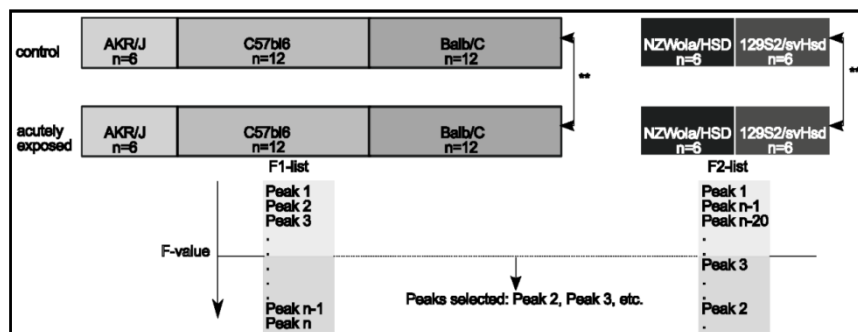


Figura 3.1: Diagrama de la selección de las áreas espectrales significativas relacionadas al progreso de la enfermedad. Dos análisis F-ANOVA fueron ejecutados por separados para cepas susceptibles y resistentes. Los picos con un valor F mayor que $F_{crit}=11.39$ (significancia estadística de 0.001) en las cepas susceptibles y simultáneamente un valor F menor que $F_{crit}=0.46$ (significancia estadística de 0.5) se seleccionaron para el análisis discriminante

ANÁLISIS DISCRIMINANTE

Para realizar el análisis discriminante optamos por un análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). El modelo PLS [15] es un método común para el análisis de datos de alta dimensionalidad. El número de variables latentes utilizadas para validar el modelo fueron elegidas a través de las gráficas de la regresión R^2 y de la varianza total explicada, con el fin de asegurar la robustez del método y evitar un sobreajuste del modelo. El algoritmo utilizado fue el propuesto por Ding y Gentleman [16] incluido en "Metabonomic" (tolerance for convergence=1e-03, maximum number of iteration allowed = 100). Previo al análisis, la matriz de datos espectrales fue centrada y escalada (Autoscaling).

El algoritmo fue primeramente entrenado con un número de muestras seleccionadas de manera aleatoria y posteriormente validado con el resto. Este proceso fue repetido 100 veces con permutaciones aleatorias de los datos para reducir errores de tipo I. El porcentaje de muestras correctamente clasificadas fue calculado como medida del éxito del modelo.

3. Resultados.

MORFOMETRÍA Y NIVELES DE CARBOXIHEMOGLOBINA

Se realizaron exámenes de histopatología y niveles de carboxihemoglobina sobre los animales crónicamente expuestos al humo del tabaco, los cuales fueron sacrificados tras un periodo de exposición al tabaco de 6 meses. Durante este periodo, los niveles de carboxihemoglobina fueron medidos 15 minutos después de la exposición diaria al humo de tabaco, obteniendo un nivel medio del 7.75%. Este valor es dos veces mayor al nivel habitual de carboxihemoglobina en sangre para ratones de esta cepa (aproximadamente 2.8%).

El análisis morfométrico de la muestras mediante microscopía óptica mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en el AIA y en L_M de las paredes alveolares en los animales crónicamente expuestos (tabla 3.3 y figura 3.2). De esta forma se verifica la patología del EPOC inducido por el humo del tabaco, donde una exposición prolongada al humo provocará un incremento del espacio intraalveolar en ratones.

	CONTROL	TABACO
AIA (μm^2)	831.99 \pm 39.51	1088.34 \pm 54.6 *
L_M vertical (μm)	25.4 \pm 0.95	28.47 \pm 0.69 *
L_M horizontal (μm)	24.71 \pm 0.77	28.10 \pm 0.58 *

Tabla 3.3: Cambios morfométricos (AIA and L_M) estimados mediante tinte de hematoxilina-eosina en el modelo crónico. Las medidas están expresadas como media y error estándar de la medida. (*) Significancia estadística $p < 0.05$ frente al grupo control.

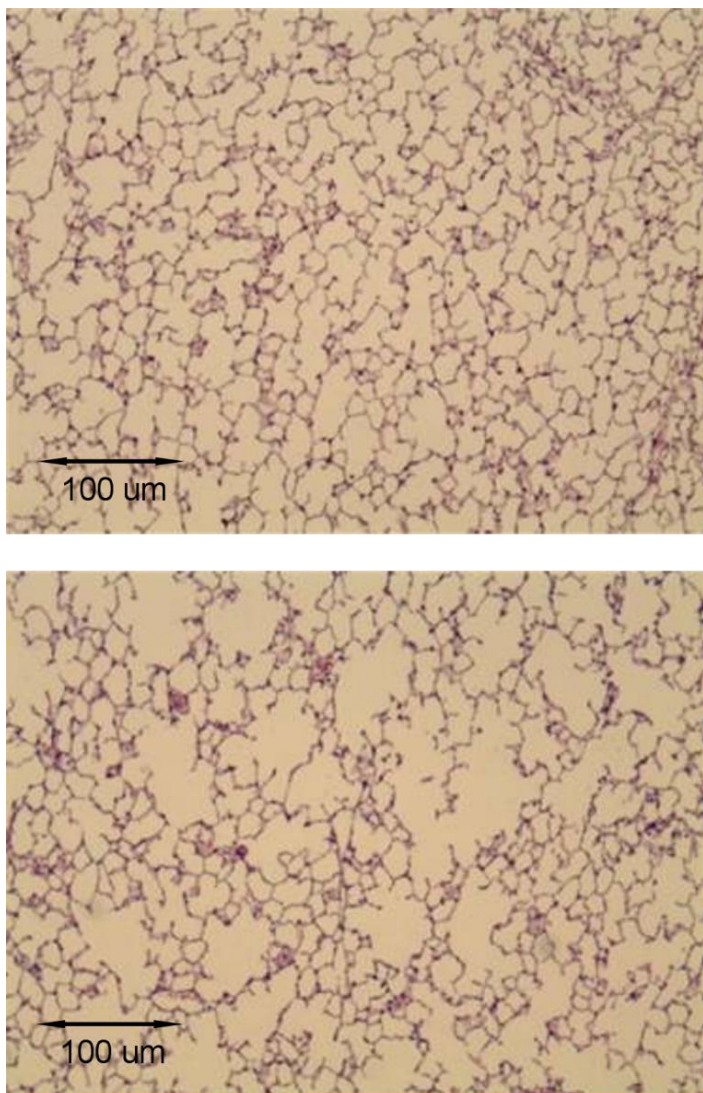


Figura 3.2: Imágenes microscópicas mediante tinte de hematoxilina-eosina (10x) del modelo crónico de ratón. Arriba: imagen representativa del pulmón en estado normal. Abajo: imagen representativa del pulmón expuesto a seis meses de humo de tabaco.

ANALISIS DISCRIMINANTE

A través del análisis estadístico F fueron seleccionados 6 metabolitos que combinaban para el modelo agudo un valor F alto en las cepas susceptibles (diferencias estadísticas entre grupos control y tratado) y un valor F bajo en las cepas resistentes (sin diferencias estadísticas entre grupos control y tratado). La figura 3.3 muestra el espectro representativo de cada cepa animal enfatizando las diferencias halladas por nuestro método. La señales fueron identificadas y asignadas según la literatura [17-19], la base de datos del metaboloma humano [20], y el análisis del los picos cruzados característicos de los espectros bidimensionales (figura 3.4). Los desplazamientos químicos de los metabolitos identificados están recogidos en la tabla 3.4.

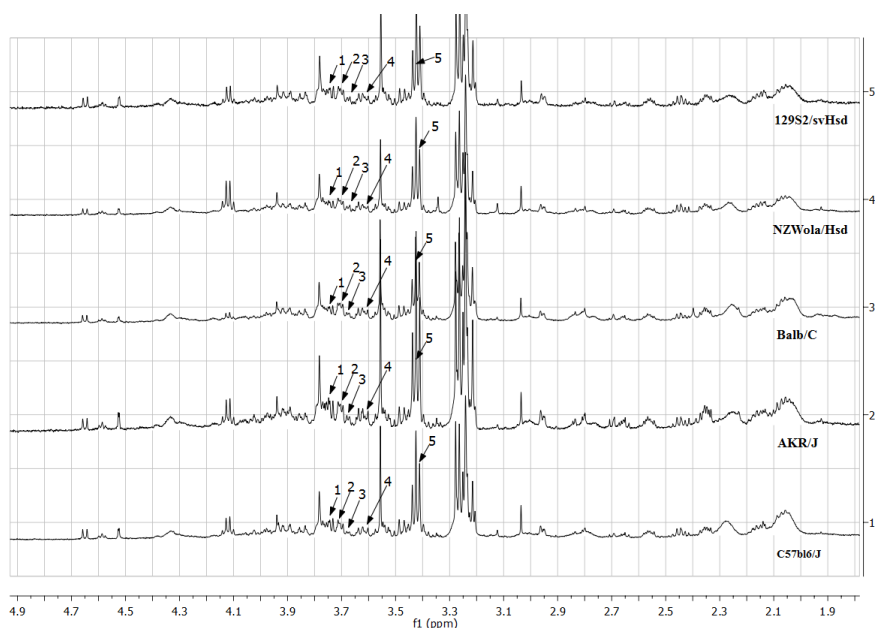


Figura 3.3: Sección alifática del espectro de protón característico de animales fumadores (animales control muestran un espectro similar). En la figura se han destacado las señales seleccionadas para construir el modelo predictivo. Las asignaciones son: glutatión (1), glicerofofocolina (2), no identificado (isoleucina) (3), fosfofocolina (4) y taurina (5).

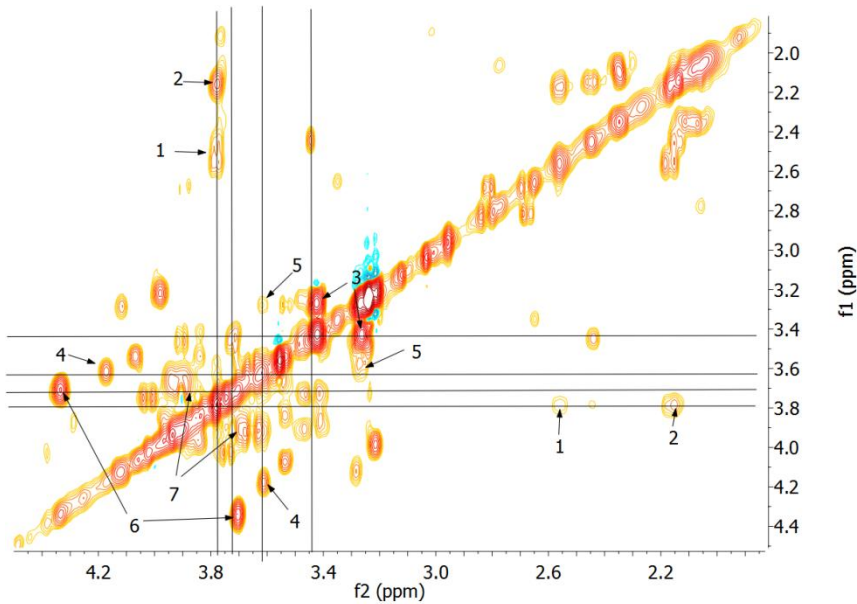


Figura 3.4: Espectro bidimensional COSY sobre el que se han asignado los picos cruzados de los metabolitos seleccionados para construir el modelo predictivo: glutatión (1,2), taurina (3), fosfocolina (4,5) y glicerofosfocolina (6,7).

Posición del pico (ppm)	Metabolitos postulados	Intensidad Relativa	
		Exposición Crónica	Control
3.41	Taurina	0.64 ± 0.06	0.55 ± 0.06
3.42	Taurina	0.74 ± 0.07	0.68 ± 0.07
3.62	Fosfocolina	0.17 ± 0.03	0.14 ± 0.02
3.68	No Identificado (Isoleucina)	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.01
3.71	Glicerofosfocolina	0.29 ± 0.03	0.025 ± 0.02
3.76	Glutatión	0.25 ± 0.03	0.19 ± 0.02

Tabla 3.4: Asignación e intensidades relativas de los desplazamientos químicos seleccionados para construir del modelo crónico de ratón AKR/J. Las medidas están expresadas como media ± desviación estándar.

Usando los seis desplazamientos químicos seleccionados, se investigó las diferencias entre los grupos control y los aguda y crónicamente expuestos al humo mediante análisis PLS. El número de componentes PLS usadas para validar las muestras fueron seleccionadas mediante las gráficas de la varianza explicada y de la regresión R^2 de cada modelo (figura 3.5). Los tres modelos PLS fueron contruidos con 3 variables latentes. El primer modelo fue entrenado con 7 muestras de ratón AKR/J sano y 8 muestras crónicas, y posteriormente, validado con otros 7 ratones AKR/J crónicos y 6 sanos. El segundo modelo fue entrenado con 15 ratones sanos y 15 ratones agudamente expuestos correspondientes a las cepas susceptibles (Balb/C, C57bl6/j y AKR/J), y validado con otros 15 ratones sanos y 15 ratones agudamente expuestos de las mismas cepas. El último modelo corresponde a los ratones resistentes al desarrollo del EPOC, y fue entrenado y validado con 6 ratones control y 6 ratones fumadores. Los resultados de predicción están recogidos en la tabla 3.5.

Modelo PLS-DA	Validación	Predicción Tabaco (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Crónico AKR/J [crónico(8), Control(7)]	crónico (7) control(6)	100 ± 0	100 ± 0	85 ± 7
Susceptible [agudo(15), control(15)]	agudo(15) control(15)	72 ± 9	72 ± 7	71 ± 6
Resistentes [agudos(6), control(6)]	agudo (6) control(6)	59 ± 15	62 ± 12	63 ± 11

Tabla 3.5: Éxito de predicción entre ratones expuestos al humo del tabaco y ratones control de los modelos PLS-DA desarrollados. Los modelos fueron entrenados y validados 100 veces con muestras escogidas de forma aleatoria. Los resultados mostrados están expresados como media ± desviación estándar.

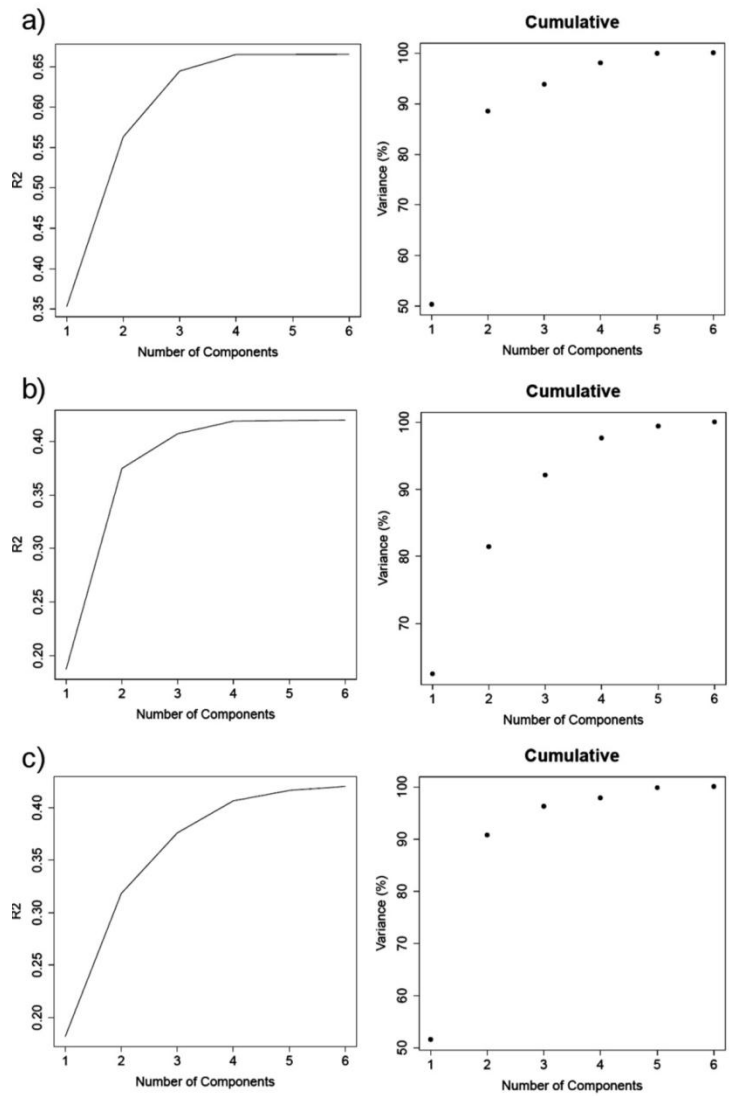


Figura 3.5: Regresión R2 y porcentaje de la varianza explicada de los modelos PLS: (a) ratones AKR/J (8 crónicos y 7 control), (b) ratones de cepas susceptibles (15 agudos y 15 control), (c) ratones de cepas resistentes (6 agudos y 6 control).

Como muestra la tabla 3.4, en los animales crónicamente expuestos se produce un incremento de las concentraciones de taurina, glutatión, fosfocolina y glicerofosfocolina, mientras que los niveles de un metabolito no identificado (posiblemente isoleucina) decrecen.

4. Conclusiones.

El diagnóstico precoz del EPOC es crucial en el tratamiento de la enfermedad. Con tal objetivo, este trabajo propone el análisis metabonómico como herramienta para la detección de biomarcadores tempranos de la enfermedad, cuando aún no existen o no son detectables mediante las tecnologías actuales, alteraciones morfométricas o funcionales en el pulmón.

El modelo de enfisema en ratones utilizado en el estudio consiste en un método testado de inducción de la EPOC a través de una exposición prolongada al humo del tabaco. Dicha exposición provocará una serie de cambios metabólicos, que podrán estar relacionados o no con la inducción de la EPOC. Con el fin de discernir la información metabólica únicamente relacionada con la progresión de la EPOC, fueron incluidas en el estudio cepas de ratones susceptibles de desarrollar la enfermedad (AKR/J, C57bl6/j, y Balb/C) y cepas resistentes a la EPOC (NZWola/Hsd y 129S2/svHsd). De esta forma, el análisis cruzado de ambos subgrupos nos permitirá identificar el perfil metabólico de la EPOC por humo de tabaco.

Los resultados muestran que las intensidades de las señales de 6 metabolitos característicos (glutacion, glicerofosfocolina, fosfocolina, taurina y un metabolito no identificado, probablemente isoleucina) permiten discriminar entre muestras control y agudamente expuestas al humo del tabaco con un éxito superior al 70% para las cepas susceptibles. Por el contrario, las señales seleccionadas fallan al intentar clasificar las muestras de las cepas resistentes, con un porcentaje de éxito en la clasificación de alrededor del 60% con una desviación estándar del 15%. Así mismo, cuando utilizamos 6 señales metabólicas en el desarrollo de un PLS-DA sobre las muestras crónicamente expuestas al humo del tabaco, obtenemos un porcentaje de éxito en la clasificación del 100%.

Las señales metabólicas utilizadas en el desarrollo de los modelos predictivos fueron seleccionadas de una lista de cerca de 70 picos en virtud de su capacidad específica para separar los grupos control y agudamente expuestos al humo del tabaco en cepas proclives a desarrollar EPOC y asimismo no conseguir separar ambos grupos con una significancia

estadística suficiente en cepas resistentes a la inducción de la EPOC. Por lo tanto, las variaciones de intensidad de las señales seleccionadas están sin duda vinculadas a la vía de alteración metabólica de la EPOC inducida por el humo de tabaco, puesto que los metabolitos seleccionados también son capaces, y con un mayor porcentaje de éxito, de separar los grupos control de los crónicamente expuestos. Este hecho incrementa la importancia de nuestro método para detectar alteraciones metabólicas sutiles pero significativas.

El incremento de la concentración del glutatión presente en el tejido pulmonar, puede usarse como biomarcador tanto del EPOC precoz como del crónico. El glutatión (GSH) es un tripéptido presente en el fluido de revestimiento epitelial, que al contener un grupo sulfhidrilo (-SH) le permite actuar como antioxidante protegiendo a las células epiteliales [21, 22]. Las alteraciones en el metabolismo alveolar y pulmonar del glutatión son características ampliamente reconocidas de las principales enfermedades inflamatorias pulmonares, incluida la EPOC [23, 24]. La concentración del glutatión intra y extracelular se muestra como un factor crítico en el mantenimiento de la integridad epitelial tras la exposición al humo del tabaco. El estrés oxidativo producido tras la inhalación de humo de tabaco inducirá a la síntesis de glutatión por parte de las células bronquiales como medida antioxidante. Así mismo, la concentración de otros antioxidantes como la glucosa o la taurina también se incrementará en el epitelio pulmonar en un estado de estrés oxidativo para intentar regular los niveles antioxidantes. De esta forma, se ha demostrado como la capacidad antioxidante de los pacientes con EPOC se reduce significativamente en comparación con sujetos sanos no fumadores [25].

Los resultados de nuestro estudio confirman que a través del análisis por ^1H -RMN se pueden determinar los fenotipos de exposición al humo del tabaco en modelos animales sin necesidad de llevar a cabo análisis morfométricos o funcionales, los cuales son técnicamente dificultosos, caros y en muchos casos no decisivos. Además, el análisis metabonómico del tejido pulmonar abre las puertas al análisis de muestras menos invasivas en el estudio de los efectos del tabaco como son los exhalados pulmonares, el lavado bronqueo-alveolar, etc.

El análisis metabonómico del tejido pulmonar se muestra como una aproximación novedosa en el estudio de los efectos del tabaco sobre

dicho tejido donde únicamente existe una publicación previa focalizada sobre células epiteliales in vitro [26]. En este estudio hemos demostrado como la exposición al humo del tabaco altera la concentración de diferentes metabolitos en las tres cepas susceptibles al desarrollo de la EPOC.

Las especies reactivas de oxígeno son altamente eficaces en la eliminación de contaminantes, pero cuando estos residuos se encuentran muy cerca de las membranas celulares, provocarán una oxidación de la membrana fosfolipídica mediante peroxidación lipídica. La peroxidación de los ácidos grasos polisaturados está relacionada con la patogénesis de múltiples formas de lesión pulmonar [27]. Este proceso puede causar cambios en las concentraciones de fosfocolina y glicerofosfocolina, alteraciones que hemos detectado mediante el análisis metabonómico [28-32].

Como conclusión, queremos destacar como la identificación del perfil metabólico de la exposición al humo del tabaco en el pulmón abre una emocionante manera de entender la fisiopatología de las enfermedades pulmonares inflamatorias relacionadas con la exposición al tabaco, por tanto, con la EPOC. No cabe duda de que el tabaco modifica el perfil metabólico normal del pulmón, produciendo alteraciones en los biomarcadores moleculares individuales señalados. Pero nuestro método va más allá, mostrando el profundo impacto tóxico y específico del tabaco sobre el metabolismo pulmonar, donde biomarcadores holísticos o el propio espectro en sí mismo representarán la huella dactilar de la enfermedad.

5. Referencias.

1. Lindon JC, Nicholson JK, Everett JR. NMR spectroscopy of biofluids. Annual Reports on Nmr Spectroscopy, Vol 38. Academic Press Inc, San Diego, 1999; pp. 1-88.
2. Bollard ME, Garrod S, Holmes E, Lincoln JC, Humpfer E, Spraul M, Nicholson JK. High-resolution H-1 and H-1-C-13 magic angle spinning NMR spectroscopy of rat liver. *Magn Reson Med* 2000; 44(2): 201-207.
3. Garrod S, Humpfer E, Spraul M, Connor SC, Polley S, Connelly J, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. High-resolution magic angle spinning H-1 NMR spectroscopic studies on intact rat renal cortex and medulla. *Magn Reson Med* 1999; 41(6): 1108-1118.
4. Cheng LL, Chang IW, Smith BL, Gonzalez RG. Evaluating human breast ductal carcinomas with high-resolution magic-angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* 1998; 135(1): 194-202.
5. Churg A, Wang RD, Xie C, Wright JL. alpha-1-Antitrypsin ameliorates cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168(2): 199-207.
6. Dhami R, Gilks B, Xie C, Zay K, Wright JL, Churg A. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1-antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22(2): 244-252.
7. Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease * 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* 2002; 57(10): 908-914.
8. Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Whittaker K, Hoidal JR, Cosio MG. The

development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(9): 974-980.

9. Morris A, Kinnear G, Wan WY, Wyss D, Bahra P, Stevenson CS. Comparison of cigarette smoke-induced acute inflammation in multiple strains of mice and the effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on these responses. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327(3): 851-862.

10. Yao H, Edirisinghe I, Rajendrasozhan S, Yang SR, Caito S, Adenuga D, Rahman I. Cigarette smoke-mediated inflammatory and oxidative responses are strain-dependent in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294(6): L1174-1186.

11. Rubio M, Sanchez-Cifuentes M, Ortega M, Peces-Barba G, Escolar J, Verbanck S, Paiva M, Gonzalez Mangado N. N-acetylcysteine prevents cigarette smoke induced small airways alterations in rats. *Eur Respir J* 2000; 15(3): 505-511.

12. Ripley BD. Modelling Spatial Patterns. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1977; 39(2): 172-212.

13. Adam BL, Vlahou A, Semmes OJ, Wright GL, Jr. Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers. *Proteomics* 2001; 1(10): 1264-1270.

14. Wright S. The interpretation of population-structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 1965; 19(3): 395-420.

15. Kramer R. Chemometric techniques for quantitative analysis. Marcel Dekker, New York, 1998.

16. Ding B, Gentleman R. Classification Using Generalized Partial Least Squares. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 2005; 14(2): 280-298.

17. Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, Llacer JL, Piotto M, Assemet O, Celda B. ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of

intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed* 2004; 17(4): 191-205.

18. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 2000; 13(3): 129-153.

19. Sitter B, Sonnewald U, Spraul M, Fjosne HE, Gribbestad IS. High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue. *NMR Biomed* 2002; 15(5): 327-337.

20. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, Hau DD, Psychogios N, Dong E, Bouatra S, Mandal R, Sinelnikov I, Xia J, Jia L, Cruz JA, Lim E, Sobsey CA, Shrivastava S, Huang P, Liu P, Fang L, Peng J, Fradette R, Cheng D, Tzur D, Clements M, Lewis A, De Souza A, Zuniga A, Dawe M, Xiong Y, Clive D, Greiner R, Nazyrova A, Shaykhtudinov R, Li L, Vogel HJ, Forsythe I. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(Database issue): D603-610.

21. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(12 Pt 2): S38-43.

22. Neighbour H, Tennant RC, Erin EM, Kathirgamanathan G, Tan AJ, Nicholson GC, Kon OM, Barnes PJ, Hansel TT. Molecular mechanisms of smoking and COPD. In: Wang XL, Scott DA, eds. Molecular mechanisms of tobacco-induced diseases. Nova Biomedical Books, [Hauppauge], N.Y., 2005; pp. 289-331.

23. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 1999; 277(6 Pt 1): L1067-1088.

24. Harju T, Mazur W, Merikallio H, Soini Y, Kinnula V. Glutathione-S-transferases in lung and sputum specimens, effects of smoking and COPD severity. *Respiratory Research* 2008; 9(1): 80.

25. Avissar N, Finkelstein JN, Horowitz S, Willey JC, Coy E, Frampton MW, Watkins RH, Khullar P, Xu YL, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 1996; 14(2): L173-L182.
26. Vulimiri SV, Misra M, Hamm JT, Mitchell M, Berger A. Effects of Mainstream Cigarette Smoke on the Global Metabolome of Human Lung Epithelial Cells. *Chem Res Toxicol* 2009.
27. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41(12 Pt 2): 1819-1828.
28. De Graaf RA. In vivo NMR spectroscopy : principles and techniques. 2nd ed. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2007.
29. Gillies RJ, Morse DL. In vivo magnetic resonance spectroscopy in cancer. *Annu Rev Biomed Eng* 2005; 7: 287-326.
30. Firbank MJ, Harrison RM, O'Brien JT. A comprehensive review of proton magnetic resonance spectroscopy studies in dementia and Parkinson's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2002; 14(2): 64-76.
31. Narayana PA. Magnetic resonance spectroscopy in the monitoring of multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 2005; 15(4 Suppl): 46S-57S.
32. Gonzalez-Toledo E, Kelley RE, Minagar A. Role of magnetic resonance spectroscopy in diagnosis and management of multiple sclerosis. *Neurol Res* 2006; 28(3): 280-283.

Capítulo 4

Análisis metabonómico del condensado de exhalado respiratorio como herramienta diagnóstica del EPOC clínico

En el presente capítulo se evaluará el análisis metabonómico del condensado de exhalado respiratorio como herramienta diagnóstica no invasiva de enfermedades respiratorias. Se evaluarán las limitaciones de la recolección y procesamiento de las muestras, la viabilidad de las principales técnicas de espectroscopía de alta resolución para el análisis metabonómico y, finalmente, se probará el protocolo experimental propuesto para la discriminación de pacientes de EPOC frente a sujetos control.

Los experimentos y resultados recogidos en este capítulo fueron publicados por la European Respiratory Journal en su edición de febrero de 2011 bajo el título “Is the NMR-based metabolomic analysis of Exhaled Breath Condensate accurate?” (37, 468-470, 2011).

1. Antecedentes.

La recolección del condensado del exhalado respiratorio (EBC) es un método no invasivo de obtener muestras pulmonares frente a los métodos tradicionales de recolección de secreciones como la inducción del esputo, la broncoscopia o el lavado bronqueoalveolar (BAL). La técnica se basa en que, a pesar de que la mayor parte del exhalado está compuesto por vapor de agua, éste también contiene partículas volátiles y no volátiles en suspensión. Al colectar el exhalado mediante una trampa fría (figura 4.1), el vapor de agua se condensará arrastrando al resto de partículas. Este fluido puede ser analizado mediante técnicas espectroscópicas de alta resolución, tales como espectrometría de RMN o espectrometría de masas, con el fin de obtener un perfil metabólico indirecto del tracto respiratorio. El análisis metabonómico del EBC es una aproximación simple y no invasiva para el estudio de las enfermedades del sistema respiratorio, además, estudios previos [1, 2] han propuesto el análisis metabonómico mediante RMN del EBC como un método que permite una separación definida entre pacientes con una enfermedad respiratoria y sujetos control.

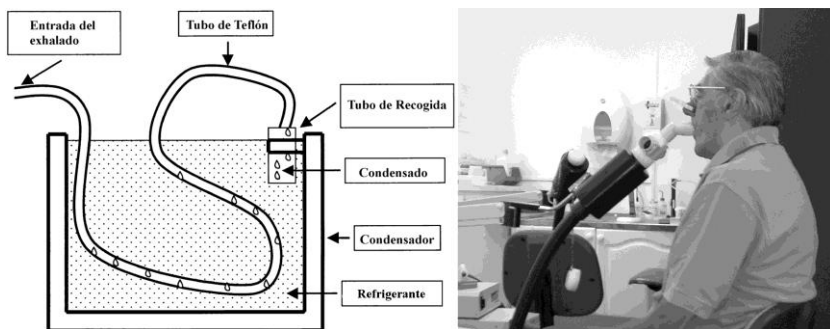


Figura 4.1: Diagrama esquemático del dispositivo de condensado del exhalado respiratorio (izquierda) e imagen del proceso de recogida del EBC de un sujeto control (derecha).

Los principales dispositivos comerciales para la recolección del EBC son EcoScreen (Jaeger, Hoechberg, Alemania) y Anacon (Biostec,

Valencia, Spain). Estos dispositivos, a pesar de basarse en el mismo principio, presentan diferencias sustanciales como el rango de temperatura de condensación o la superficie de condensación, que motivarán diferencias en los tiempos y volúmenes de adquisición [3]. No obstante, la principal diferencia entre ambos dispositivos a la hora de procesar las muestras mediante espectroscopía de alta resolución serán las fuentes de contaminación externas. El dispositivo EcoScreen conlleva la utilización de partes reutilizables, y su posterior limpieza; mientras, que por su parte, el Anacon puede utilizarse con piezas desechables minimizando las contaminaciones externas debidas al método de desinfección del aparato. En los artículos anteriormente mencionados, ya se hacía hincapié en las posibles influencias sobre el análisis debido a contaminaciones externas. Laurentiis et al.[1] exponían que la eliminación de las interferencias producidas por contaminaciones externas era crucial para un correcto análisis de los EBCs y proponían un protocolo de limpieza para la “completa eliminación de las señales del desinfectante” de las partes reutilizables de los dispositivos.

Conforme a estos trabajos previos, nuestros primeros experimentos con EBCs fueron realizados con un dispositivo EcoScreen utilizando el mismo protocolo de limpieza propuesto por Laurentiis et al. Así mismo, para comprobar que la eliminación de las señales del desinfectante era total, decidimos adquirir también un espectro del jabón utilizado en el proceso de limpieza con el fin de identificar posibles señales residuales en los espectros de las muestras de EBC. En la figura 4.2 se puede apreciar como en ciertas zonas del espectro de EBC siguen apareciendo señales residuales debidas al desinfectante. Debido a estos resultados, y antes de proseguir con los análisis, se decidió realizar una evaluación de la influencia de las señales de desinfectantes en los espectros de RMN.

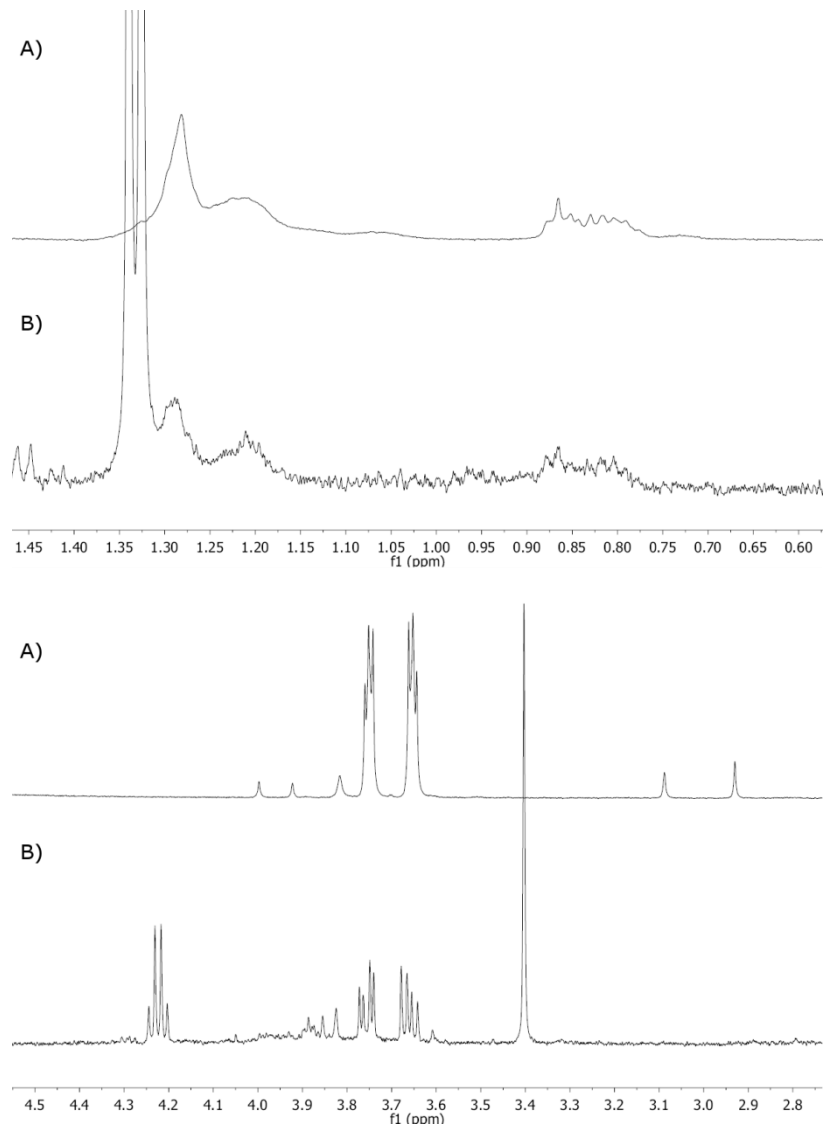


Figura 4.2: Regiones seleccionadas del espectro de ^1H del desinfectante utilizado en el proceso de limpieza (A) y del espectro de ^1H de EBC de un sujeto control (B).

2. Evaluación de señales residuales.

Para evaluar la influencia de las señales del desinfectante usado en el proceso de limpieza de las piezas reutilizables de los dispositivos de recolección, hemos comparado los espectros de ^1H -RMN de las muestras de EBC (figura 4.3). El primer espectro (figura 4.3-A) fue adquirido de un sujeto control después del protocolo estándar de limpieza recomendado por las pautas del fabricante y el Consenso Internacional en EBC [4] (desinfección durante 15 minutos usando una solución de Descogen al 1.5% y aclarar otros 15 minutos con agua). El segundo espectro (figura 4.3-B) se obtuvo después del protocolo de limpieza propuesto por Laurentiis et al. y el tercer espectro (figura 4.3-C) se obtuvo de una muestra adquirida usando un dispositivo que no utiliza partes reusables.

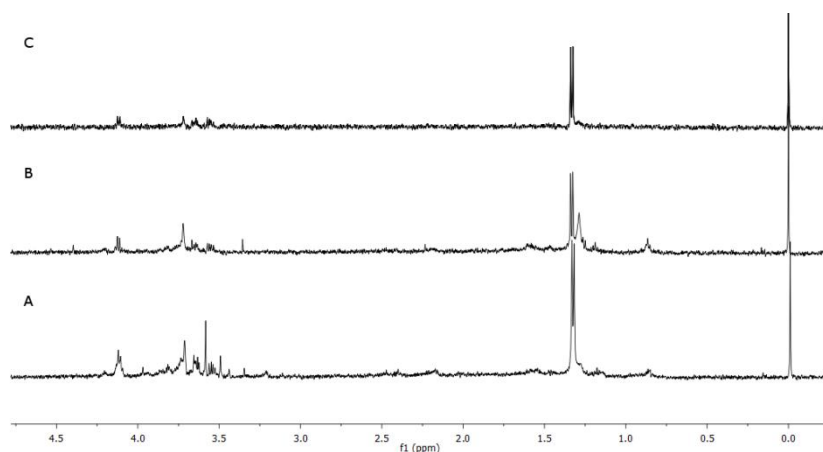


Figura 4.3: Espectros ^1H -RMN de EBC proveniente de un sujeto control después (A) del protocolo estándar de limpieza recomendado por el fabricante y el Consenso Internacional en EBC; (B) el protocolo de limpieza propuesto por Laurentiis et al.; (C) usando un dispositivo que no utiliza partes reusables del condensador. (D) ^1H -RMN de EBC con recolección de muestra y desinfección similares a las publicada por Laurentiis et al.

Todas las muestras de EBCs fueron recolectadas usando un condensador Anacon. En la figura 4.3 podemos apreciar cómo a pesar de que una gran parte de las señales del desinfectante presente en el espectro EBC fueron eliminadas mediante el protocolo de limpieza de Laurentiis, persisten señales resistentes que no se aprecian en el espectro adquirido sin partes reutilizables (figura 4.3-C). La recolección de las muestras y concentración del original (>99% de agua) fueron similares a aquellas obtenidas en el procedimiento descrito por Laurentiis, obteniéndose un espectro similar (figura 4.4-A) al publicado por Laurentiis (figura 4.4-B).

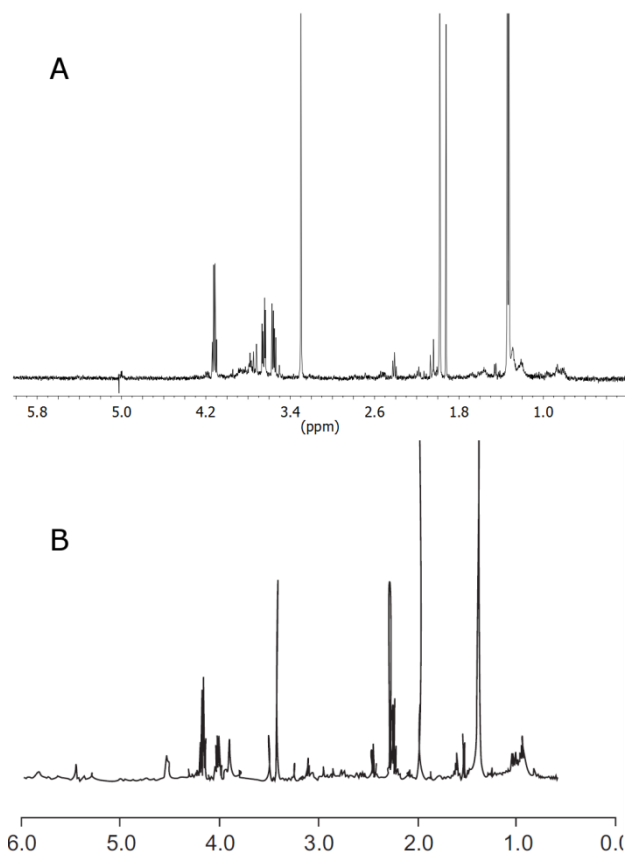


Figura 4.4: Espectro ^1H -RMN de EBC (A) con el mismo procedimiento de recolección de muestra y desinfección que el publicado por Laurentiis (B).

Así mismo, hemos comparado dos espectros ^1H -RMN (figura 4.5) procedentes de una muestra EBC de un sujeto control (figura 4.5-A) adquirido usando el dispositivo sin partes reusables y de una muestra control procedente de la condensación del aire ambiental (figura 4.5-B) bombeado al condensador mediante un dispositivo de ventilación continua. Ambas muestras fueron recolectadas en la misma escala de tiempo y el aire suministrado por el dispositivo de ventilación mecánica presentaba flujos y volúmenes de ventilación similares a los de la función respiratoria. En este caso podemos apreciar espectros similares, prácticamente blancos, donde sólo se distinguen dos señales (lactato y una señal no identificada).

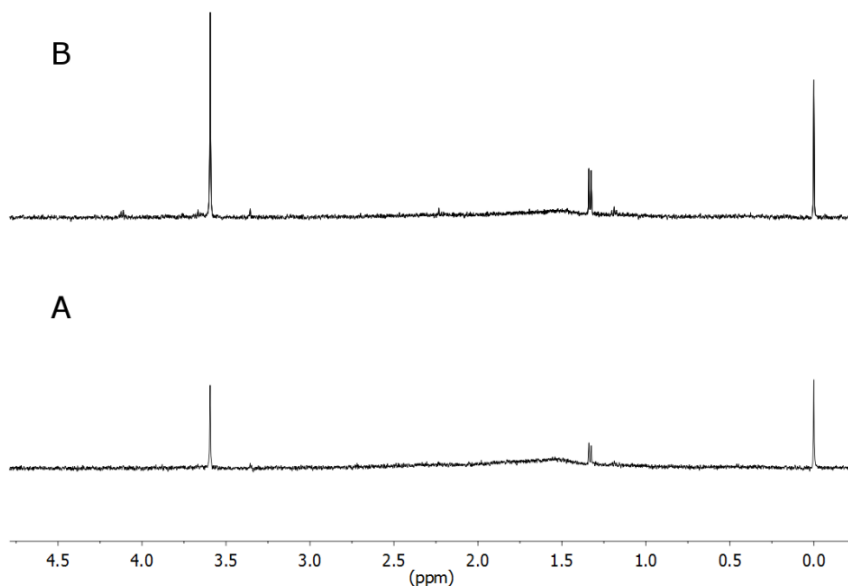


Figura 4.5: A) Espectro ^1H -RMN de EBC proveniente de un sujeto control. B) Espectro ^1H -RMN de la condensación del aire ambiental introducido en el condensador por un dispositivo de ventilación continua. Ambas muestras se recolectaron en la misma escala temporal.

En nuestra opinión, estas comparaciones indican que los estudios previos de EBCs por RMN no eran capaces de eliminar todas las señales del desinfectante usado en los protocolos de limpieza, y que cuando hemos

evitado el uso de desinfectante a través de emplear un dispositivo no reutilizable, los espectros obtenidos eran espectros blancos sin información metabólica. A la vista de los resultados, nuestra conclusión es que el análisis metabonómico por RMN no posee el grado de sensibilidad necesario para detectar el perfil metabólico pulmonar en las muestras EBC.

Acorde con estos resultados, iniciamos la línea de investigación de análisis metabonómico de EBC mediante espectroscopía de masas (MS), proponiendo esta técnica como alternativa válida por su alto grado de sensibilidad en el análisis espectroscópico de EBCs.

3. Análisis metabómico por MS.

Como introdujimos en el capítulo 2, la espectroscopía de masas es una técnica considerablemente más sensible que la espectroscopía de RMN, lo que la convierte en la candidata ideal para los análisis de muestras de EBC. En concreto, el *tándem* cromatografía de ultra-alta resolución y espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (UPLC-TOF-MS), requiriendo una preparación de muestras similar a la espectroscopía por RMN, nos permitirá detectar el perfil metabólico de la muestra de EBC que no podíamos observar a través de la espectroscopía de RMN.

Con la intención de validar la metabonomía mediante MS como herramienta discriminativa entre sujetos sanos y pacientes con alguna enfermedad respiratoria, realizamos un estudio piloto de detección de EPOC en pacientes clínicos. Para este estudio se recolectaron un total de 28 muestras de EBC, 18 muestras de pacientes con EPOC y 10 muestras de sujetos sanos, usando el dispositivo no reusable y un condensador Anacon.

Las muestras fueron liofilizadas y posteriormente diluidas con 200 μ L de agua y transferidas a placas de pocillo (*well plates*) para su análisis. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4°C hasta la inyección de 5 μ L en la columna cromatográfica. La separación cromatográfica se realizó en un sistema Waters Acquity UPLC usando un gradiente de 10 minutos con fase móvil A de ácido fórmico al 0.1% en agua y una fase móvil B de ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo. Los experimentos de espectrometría de masas por electrospray se realizaron en un equipo Micromass LCT Premier (Waters) operando en ionización positiva.

La figura 4.6 nos muestra la matriz de masas UPLC-TOF de una muestra de EBC adquirida sin partes reusables de un sujeto control (A) similar a la muestra utilizada para la adquisición del espectro RMN de la figura 4.5-A. La mayor sensibilidad de la espectrometría de masa nos permitirá obtener la información metabólica que no éramos capaces de detectar a través de la RMN. De igual manera, a través de la MS podemos comparar e identificar los cambios metabólicos que producirá el EPOC (figura 4.6-B)

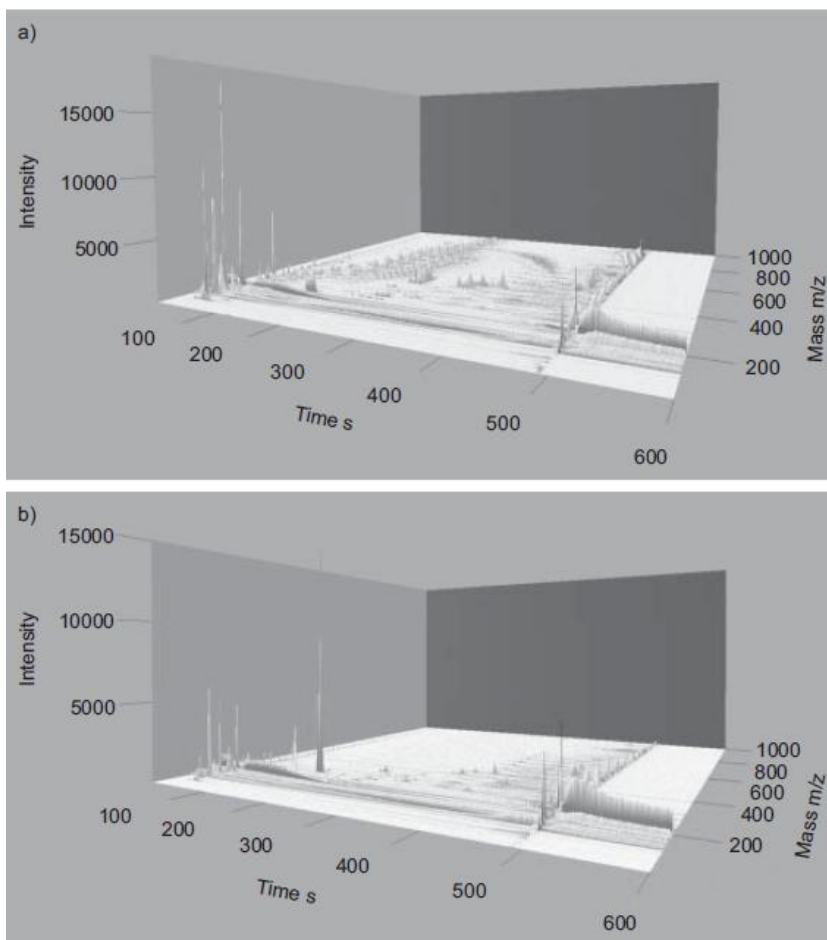


Figura 4.6: Matriz de masa tridimensional UPLC-TOF de una muestra EBC de un sujeto control (a) y de un paciente con EPOC (b), adquiridos usando un dispositivo no reusable. m/z : masa entre carga.

Los datos espectrales fueron procesados mediante el paquete de código abierto XCMS [5], el cual es capaz de detectar y alinear los picos metabólicos. El análisis multivariantes de los datos espectrales se realizó a través del paquete Metabonomic. Las diferencias espectrales entre los

pacientes de EPOC y los sujetos sanos fueron verificadas a través de un Análisis de Componentes Principales (PCA) y un análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) como muestra la figura 4.7. El PCA (figura 4.7-A) de los datos espectrales muestra una separación entre ambos grupos a través de los dos primeros componentes principales. Esta separación es claramente confirmada a través del análisis PLS (figura 4.7-B).

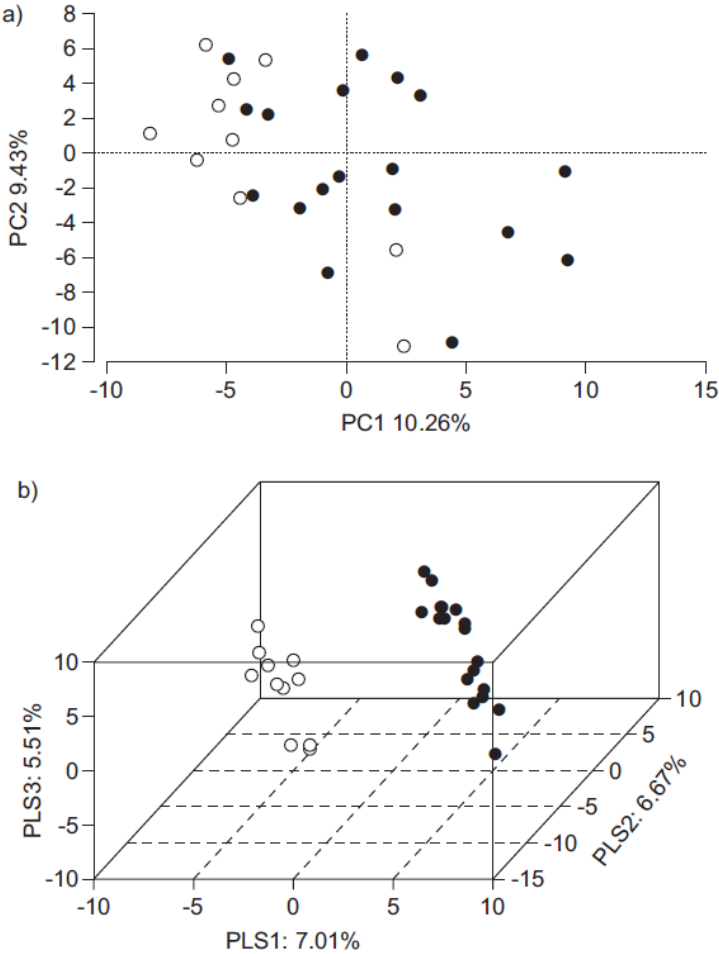


Figura 4.7: PCA (a) y PLS (b) de los datos espectrales de masas UPLC-TOF de muestras EBC provenientes de pacientes con EPOC (blanco) y controles (negro).

4. Conclusiones.

En este capítulo hemos demostrado primeramente que los protocolos de limpieza de las partes reusables de los dispositivos condensadores de exhalados respiratorios producen un perfil metabólico artificial no relacionado con la señal metabólica endógena de los pulmones.

En segundo lugar, a pesar de que el análisis metabonómico por RMN ha sido exitosamente aplicado en el estudio de diversos tipos de muestras biológicas, esta técnica no puede ser usada para el análisis espectroscópico de muestras de EBC. La espectroscopía de RMN no posee de la sensibilidad requerida para observar los metabolitos endógenos presentes en el EBC.

Finalmente, proponemos el análisis metabonómico por UPLC-MS y el uso de dispositivos no reutilizables como un estándar del análisis metabonómico de muestras de EBC.

5. Referencias.

1. de Laurentiis G, Paris D, Melck D, Maniscalco M, Marsico S, Corso G, Motta A, Sofia M. Metabonomic analysis of exhaled breath condensate in adults by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Eur Resp J* 2008; 32(5): 1175-1183.
2. Carraro S, Rezzi S, Reniero F, Heberger K, Giordano G, Zanconato S, Guillou C, Baraldi E. Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(10): 986-990.
3. Czebe K, Barta I, Antus B, Valyon M, Horváth I, Kullmann T. Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respiratory Medicine* 2008; 102(5): 720-725.
4. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Breath AETFE. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Resp J* 2005; 26(3): 523-548.
5. Smith C, Want E, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 2006; 78(3): 779 - 787.

Capítulo 5

Aproximación metabonómica para la evaluación de la sepsis experimental

La determinación de marcadores biológicos fiables capaces de predecir el resultado clínico de la sepsis sigue siendo una necesidad. El análisis metabonómico por RMN ofrece una atractiva metodología para establecer el fenotipo metabólico de la sepsis y desarrollar un nuevo modelo de evaluación diagnóstica de la enfermedad. Con este objetivo, muestras de tejido pulmonar, plasma y BAL de un modelo de sepsis experimental en rata fueron examinadas por ^1H RMN y HR-MAS.

Los PCA mostraron como el perfil metabólico del suero, BAL y tejido pulmonar, es capaz de separar las ratas septicémicas de las ratas control. Cinco metabolitos característicos (alanina, creatina, fosfoetanolamina y mioinositol), involucrados principalmente en el metabolismo energético, se ven alterados en las muestras de BAL y tejido pulmonar de las ratas con sepsis. Otros cuatro metabolitos (alanina, acetoacetato, creatina y formato) se encontraban estimulados en el suero de las ratas septicémicas. Las señales metabólicas fueron utilizadas en el desarrollo de un modelo predictivo de evaluación pronóstica de la sepsis a través de un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). La validación del modelo ofrece un éxito de predicción del 100% de las muestras.

Los resultados de este estudio han sido recogidos para la preparación del artículo "A metabolomic approach for the diagnosis of experimental sepsis" encontrándose en estado de revisión en la revista Intensive Care Medicine al cierre de la memoria de esta tesis.

1. Introducción.

La sepsis se trata de una condición clínica común en las unidades de cuidados intensivos (UCI) y su incidencia continúa en aumento [1]. La sepsis severa representa una de cada cinco admisiones en las UCIs y es la principal causa de muerte no coronaria en estas unidades hospitalarias [2], donde la demora en el tratamiento está asociada con un aumento de la mortalidad [3]. Sin embargo, el diagnóstico de la sepsis se basa en la presencia de criterios no específicos de la enfermedad y en cultivos microbiológicos de largo tiempo de espera que a menudo no son concluyentes. De esta forma, la búsqueda de biomarcadores específicos de sepsis continúa siendo una necesidad para el diagnóstico precoz de la enfermedad. Ciertos polimorfismos genéticos o la detección de proteínas anormales expresadas en el plasma y tejidos durante la sepsis han sido utilizados para su diagnóstico [4]. Sin embargo, estos métodos han mostrado unos niveles de sensibilidad y especificidad insuficientes para ser usados de forma predictiva.

El análisis metabonómico por resonancia magnética nos permitirá estudiar los cambios bioquímicos que se producen en el metabolismo del paciente durante el desarrollo de la enfermedad, con el fin de encontrar un perfil metabólico único que nos permita diagnosticar la sepsis de una forma precoz. Estudios metabonómicos previos [5, 6] en muestras de suero sanguíneo han desarrollado modelos diagnósticos de sepsis experimental presentando un éxito de predicción del 87%. El objetivo de nuestro estudio es la detección de biomarcadores metabólicos de sepsis experimental a través del análisis espectroscópico por RMN de muestras de fluido de lavado bronqueo-alveolar, suero y tejido pulmonar, la identificación de un perfil metabólico holístico que nos permita detectar la enfermedad en su fase precoz y el desarrollo de un modelo específico para la diagnosis de la enfermedad.

2. Métodos.

PREPARACIÓN DEL ANIMAL Y PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El protocolo experimental fue llevado a cabo acorde con las líneas del Comité de Investigación Animal del Hospital Universitario de Getafe. En el estudio fueron utilizadas ratas macho Sprague Daly (300-350g) aclimatadas a ciclos de día/noche de 12 horas y alimentadas con pienso Purina. La sepsis fue inducida mediante ligadura cecal y punzamiento (CLP) (n=14). Como sujetos control se utilizó animales que habían sufrido una operación “simulada” (sham) (n=13). Antes de la operación quirúrgica, los animales fueron anestesiados mediante bolo de diazepam (4 mg/kg) y ketamina (30 mg/kg). La intervención quirúrgica fue realizada bajo condiciones estériles. Se realizó una incisión laparotómica media tras la cual se procedió a anudar debajo de la válvula íleo-cecal conservando la continuidad intestinal. Posteriormente, el ciego se perforó en dos ocasiones en la frontera con el antemesentérico mediante una aguja de calibre 14. A continuación se aplicó una suave presión con el fin de exteriorizar el contenido intraluminal. Finalmente, el intestino se devolvió a la cavidad peritoneal y se cerró la laparotomía media en dos capas. De la misma forma, los animales control fueron sometidos a una operación simulada, donde se les practicó la laparotomía y la manipulación intestinal pero sin realizar la punción del mismo. En ambos casos, tras la cirugía se administró una solución salina (3 ml/100g)

Los animales fueron devueltos a sus jaulas y 24 horas después del procedimiento quirúrgico fueron de nuevo anestesiadas con un bolo de diazepam (4mg/kg) y ketamina (30 mg/kg). Primeramente, se canuló la arteria carótida para medir la presión media arterial (MAP, Hewlett Packard, modelo 66s, Nidvale, UT, EEUU) y se reabrió la incisión laparotómica de la línea media. Se identificó la aorta sobre la que se colocó una sonda ultrasónica de flujo sanguíneo (Transonics Systems, Ithaca, NY, EEUU) en la zona abdominal, sobre las arterias renales, para medir el flujo sanguíneo aórtico (Q_{Ao}). Tras las medidas hemodinámicas, se realizó un punzamiento cardíaco para extraer toda la sangre del animal. Los gases sanguíneos (Gem Premier 3000, IL Instrumentation Laboratory, Barcelona, España) y la

concentración de lactato fueron medidos sobre la sangre arterial. Finalmente el suero sanguíneo se congeló para análisis posteriores: determinación de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa, concentración de urea en suero (LDH; Integra 700) y estudios metabonómicos.

El lavado bronqueo-alveolar (BAL) se realizó mediante la instilación de 10 ml de salino, del que se recuperó entre 5 y 7 ml. Las muestras de fluido de BAL fueron congeladas a -80°C para el posterior análisis metabonómico.

Para terminar, se abrió la caja torácica para extirpar los pulmones. El pulmón izquierdo se extrajo expandiéndolo con una instilación intratraqueal de 10% de formaldehído con una presión de 20 cm de agua para análisis histológicos. El pulmón derecho fue inmediatamente congelado para análisis metabonómicos.

ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

Las muestras de tejido pulmonar fueron teñidas con hematoxilina-eosina y estudiadas mediante microscopía óptica [7] asignando un grado de daño pulmonar histológico para cada caso. Los resultados fueron evaluados por un patólogo independiente, sin informarle de la asignación de las muestras.

ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO POR RMN

Las muestras de tejido pulmonar intacto (aproximadamente 10mg) y de suero sanguíneo (40 μl) fueron examinadas mediante HR-MAS a 4°C para reducir la degradación metabólica. La adquisición de los espectros de ^1H -RMN se realizó a 500.13MHz mediante un espectrómetro Bruker AMX500 de 11.7T. Las muestras fueron introducidas en un rotor de óxido de zirconio de 50 μl de capacidad e impregnadas con 15 μl de una disolución de agua deuterada (D_2O) y TSP al 0.1 mM. La velocidad de giro se fijó a 400 Hz para eliminar los artefactos de giro del espectro. Las muestras de BAL fueron liofilizadas y re-disueltas en 100 μl de D_2O y 100 μl de disolución de TSP 0.1 mM en D_2O previamente a su análisis mediante un espectrómetro Bruker AV500 a 4°C .

Además de las adquisiciones unidimensionales, se llevaron a cabo una serie de experimentos bidimensionales para la asignación de los componentes bioquímicos. Entre espectros bidimensionales consecutivos se adquirió un espectro ^1H RMN como control de la degradación metabólica, no apreciando señales de esta degradación entre los espectros adquiridos bajo las mismas condiciones.

Los espectros de las muestras de suero y tejido se registraron con una resolución de 16 mil puntos mientras que los espectros de BAL se registraron en 32 mil puntos y fueron promediadas 256 adquisiciones para mejorar la relación señal-ruido. La adquisición de los datos supuso un tiempo aproximado de 13 minutos por muestra. Se usó una secuencia basada en el primer incremento de la secuencia de pulsos NOESY, modificada para efectuar la supresión de la señal de resonancia del agua y limitar los efectos de las inhomogeneidades de B_0 y B_1 en el espectro (relaxation delay-90°-t1-90°-tm-90°-acquire FID). En esta secuencia el pulso secundario de radiofrecuencia se aplica sobre la frecuencia de resonancia del agua durante el tiempo de relajación de 2s y el tiempo de mezcla (tm=150ms), con un t1 fijo a 3 μ s. La anchura espectral fue de 8333.33 Hz. Antes de la transformada de Fourier, las señales del FID fueron multiplicadas por una función exponencial correspondiendo a una anchura lineal de 0.3Hz. Los espectros fueron referenciados al singlete del TSP a 0ppm.

Los espectros bidimensionales COSY fueron adquiridos bajo las siguientes condiciones: presaturación del agua durante el tiempo de relajación, anchura espectral de 5122.95Hz en ambas dimensiones, 2.000 puntos en f2 y 256 incrementos en f1. En ambas dimensiones se aplicó una función de ventana sinusoidal sin desplazamiento y sobre la dimensión f1 se realizó una técnica de relleno con ceros ("zero filling"). ^1H - ^1H TOCSY se registró en el modo Tiempo Proporcional al Incremento de Fase sensible a la fase (TPPI phase sensitive), con presaturación de la señal del agua durante el tiempo de relajación de 1s, una anchura espectral de 5122.95Hz en ambas dimensiones, 60ms de tiempo de mezcla, 2.000 puntos en f2 y 256 incrementos en f1. Se aplicó "Zero filling" sobre f1 y una función de ventana cuadrada sinusoidal sin desplazamiento en ambas dimensiones. Los experimentos de selección de gradiente HSQC fueron registrados con los siguientes parámetros: 95 μ s de desemparejamiento GARP 13C, una anchura espectral de 8333 Hz y 21 kHz en las dimensiones de ^1H y ^{13}C respectivamente, 2.000 puntos en f2 y 256 incrementos en f1. Se aplicó

“Zero filling” sobre f_1 y una función de ventana cuadrada sinusoidal sin desplazamiento en ambas dimensiones.

PROCESADO ESPECTRAL

Con el fin de eliminar los artefactos aleatorios de la supresión del agua, la región de desplazamiento químico entre 5.00-5.20 ppm fue excluida del análisis. Por una razón similar, la región entre 0-0.04 ppm también fue excluida al contener la señal de la referencia interna (TSP). Sobre los espectros unidimensionales de protón se realizó una corrección de la línea base mediante el método Rocke & Xi [8] e integrados en “buckets” de 80.04 ppm con el fin de compensar las variaciones de posiciones de desplazamiento químicos entre los espectros [9]. Finalmente los espectros fueron normalizados por la suma total de todas las regiones espectrales. El procesamiento de los espectros unidimensionales fue realizado con el paquete “Metabonomic” (versión 3.3.1) de R, mientras que el de los espectros bidimensionales se realizó con MestRenova v. 6.03 (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, España).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y MODELADO

Las variables hemodinámicas y bioquímicas fueron comparadas mediante un test t de Student y expresadas como media \pm error estándar. Los análisis metabonómicos incluyeron un Análisis de Componentes Principales (PCA) y un análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA). Primeramente se realizó un análisis PCA sobre las tres matrices de datos conformadas por los espectros unidimensionales de las muestras de tejido, BAL y suero. Los datos fueron centrados y escalados previamente al análisis. El objetivo de este análisis es extraer la información espectral más significativa de la información metabólica total. Posteriormente, utilizando los desplazamientos químicos destacados por los PCAs se realizaron análisis discriminantes PLS para investigar las diferencias significativas entre grupos. El algoritmo usado en estos análisis fue el propuesto por Ding and Gentleman [10] (Tolerancia de convergencia=1e-03, número máximo de interacciones=100). El número de componentes PLS usadas en el modelo de validación fueron elegidas acorde a las gráficas de la varianza explicada, R^2 y el error medio cuadrado de la validación cruzada. Las funciones de clasificación fueron entrenadas con un número de

muestras escogidas de forma aleatoria según la probabilidad de pertenecer a cada grupo y posteriormente fueron usadas estas funciones para clasificar el resto de las muestras como una validación interna. Este proceso fue repetido 100 veces con permutaciones de los datos para reducir los errores de tipo I. El porcentaje de muestras correctamente clasificadas sirvió como medida del éxito del modelo. Los análisis estadísticos descritos fueron también realizados con el paquete “Metabonomic” de R.

3. Resultados.

RESULTADOS HEMODIÁMICOS Y LACTATO EN SUERO

No se aprecia diferencia en la medida de la MAP, mientras que la medida de Q_{Ao} fue menor en los animales con sepsis respecto al grupo control (Tabla 5.1). Además los animales del grupo sepsis desarrollaron acidemia, hiperlactemia, hipocapnia e incremento en el suero de la actividad de LDH, AST y ALT (Tabla 5.1)

	Control	Sepsis	p value
MAP (mmHg)	129 ± 3	128 ± 6	0.8
Q_{Ao} (mL/s)	20 ± 2	9 ± 1	0.001
pH	7.40 ± 0.01	7.37 ± 0.01	0.01
PaCO ₂ (mm Hg)	41 ± 3	36 ± 4	0.01
PaO ₂ (mm Hg)	79 ± 2	82 ± 2	0.3
Suero urea (mmol/L)	32 ± 1	43 ± 3	0.01
Suero LDH (IU/L)	281 ± 41	445 ± 68	0.04
Suero AST (IU/L)	42 ± 1	68 ± 10	0.02
Suero ALT (IU/L)	113 ± 6	279 ± 68	0.03

Tabla 5.1: Resultados hemodinámicos, gases en sangre y variables bioquímicas en animales septicémicos y control. Los parámetros de gases en sangre se refieren a sangre arterial. MAP, presión arterial media; Q_{Ao} , flujo aórtico medio; LDH, lactato deshidrogenasa; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa. Los resultados están expresados como media ± SEM.

Con respecto a los resultados histológicos, el análisis mediante microscopio óptico no mostró anomalías en los pulmones septicémicos, y el rango del daño pulmonar era comparable en ambos grupos.

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES E IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES

Con el fin de analizar las diferencias en los espectros de las muestras de ratas septicémicas y control se realizó un análisis multivariante no supervisado de componentes principales.

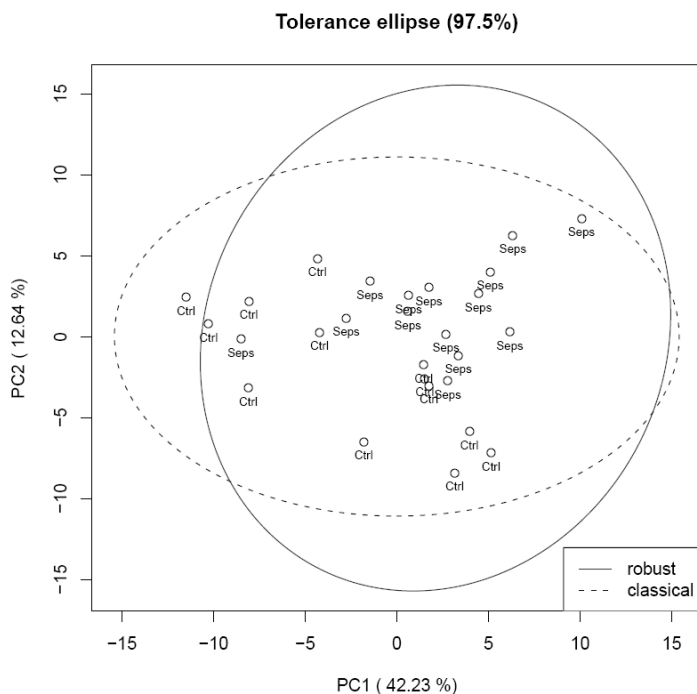


Figura 5.1: Gráfica de scores del PCA de los espectros ^1H RMN de tejido pulmonar. Se aprecia como las componentes principales 1 y 2 diferencian claramente los grupos control (Ctrl) y sepsis (SSPS)

En la figura 5.1 podemos apreciar como a través de las dos primeras componentes principales conseguimos una separación casi perfecta de los dos grupos para las muestras de tejido pulmonar, mientras que para las muestras de BAL la separación se conseguirá mediante las componentes principales primera y tercera (figura 5.2), y finalmente mediante la segunda y la tercera (figura 5.3) para las muestras de suero.

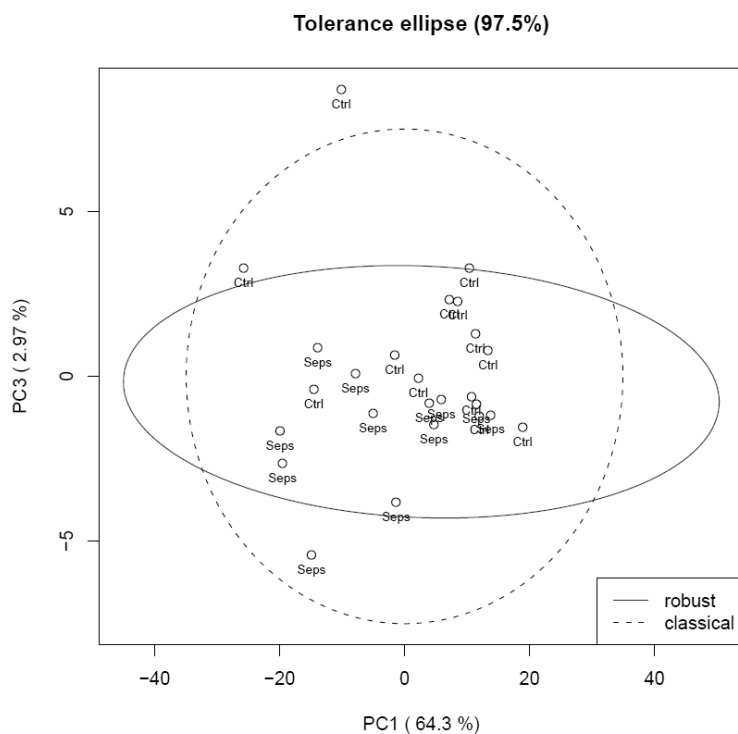


Figura 5.2: Gráfica de scores del PCA de los espectros ^1H RMN de fluido BAL. Se aprecia como las componentes principales 1 y 3 diferencial claramente los grupos control (Ctrl) y sepsis (SSPS).

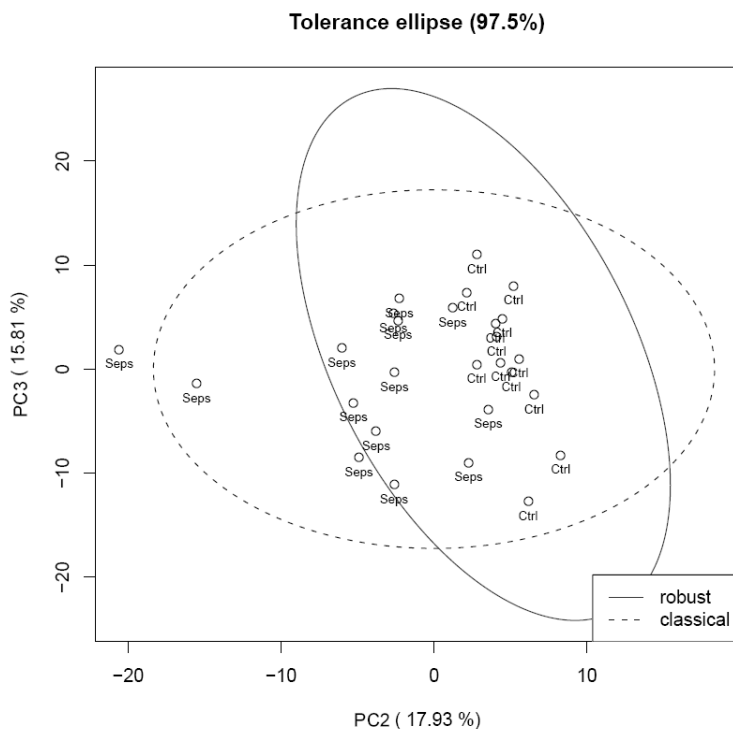


Figura 5.3: Gráfica de scores del PCA de los espectros ^1H RMN de suero sanguíneo. Se aprecia como las componentes principales 2 y 3 diferencian claramente los grupos control (Ctrl) y sepsis (SSPS).

Analizando las gráficas de loadings de los PCAs de las muestras de tejido pulmonar (figura 5.4) y BAL (figura 5.5) podemos observar las variables más significativas para explicar la varianza del conjunto. En otras palabras, los “buckets” de desplazamiento químico con mayor peso en el eje de separación de las muestras fueron seleccionados como potenciales biomarcadores.

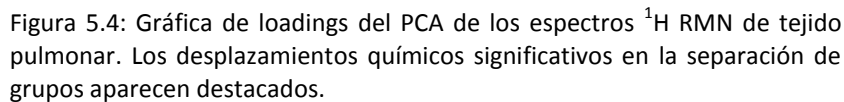


Figura 5.4: Gráfica de loadings del PCA de los espectros ^1H RMN de tejido pulmonar. Los desplazamientos químicos significativos en la separación de grupos aparecen destacados.



Figura 5.5: Gráfica de loadings del PCA de los espectros ^1H RMN de fluido BAL. Los desplazamientos químicos significativos en la separación de grupos aparecen destacados.

Así mismo, dado que la gráfica de loadings del PCA de las muestras de suero no destacaba regiones discriminantes significativas (figura 5.6), se llevó a cabo un análisis de coeficientes de regresión PLS (figura 5.7) para completar la gráfica de loadings del PCA de las muestras de suero. Los potenciales biomarcadores fueron seleccionados mediante un test T^2 de Hotelling.

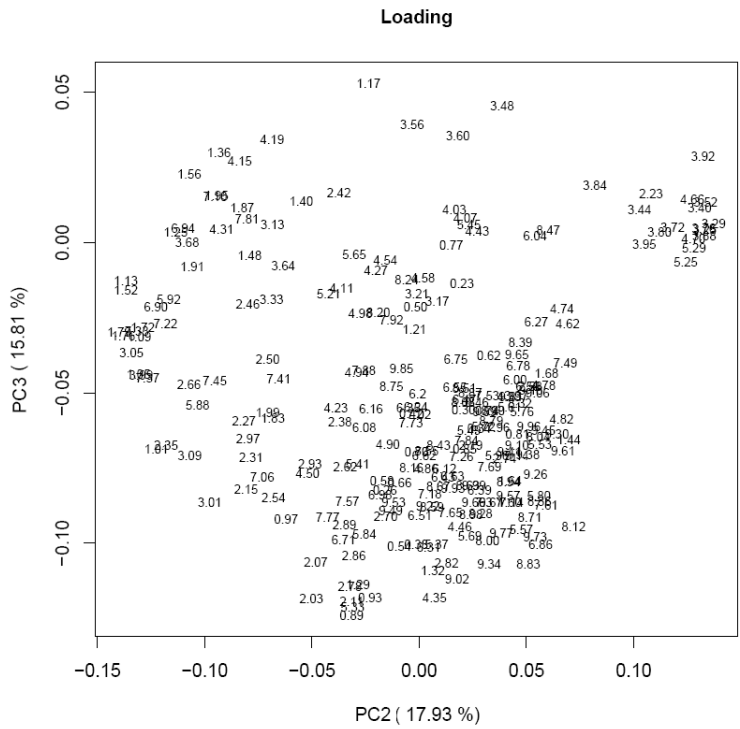


Figura 5.6: Gráfica de loadings del PCA de los espectros ^1H RMN de suero. No se aprecian desplazamientos químicos destacados.

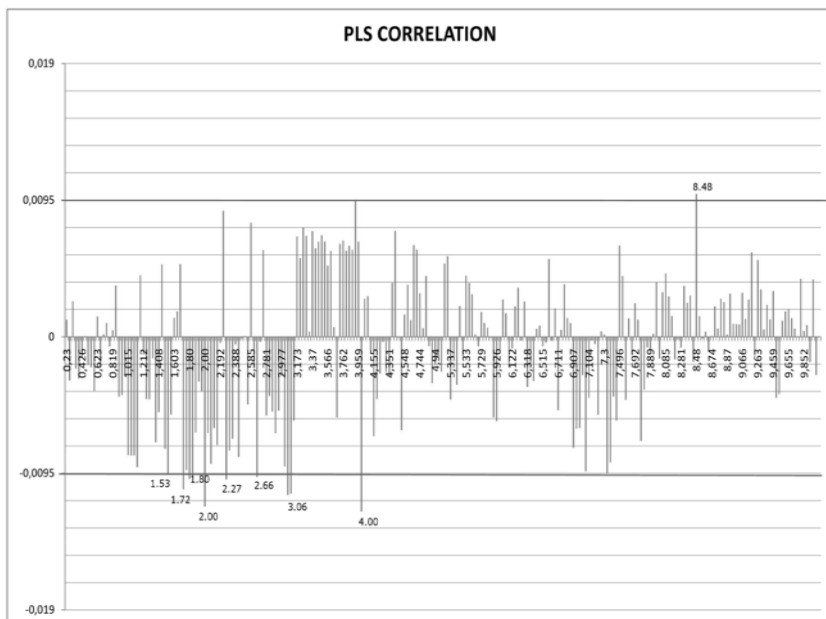


Figura 5.7: Análisis de coeficientes de regresión PLS de los espectros ^1H RMN de suero. Los desplazamientos químicos más significativos han sido etiquetados.

La figura 5.8 muestra los espectros representativos enfatizando las principales diferencias destacadas por nuestro método. Las señales de resonancia fueron identificadas de acuerdo a la bibliografía existente [11-13], la base de datos del proyecto “the Human Metabolome Database” [14] y la identificación de los picos cruzados característicos de los espectros bidimensionales (figuras 5.9 y 5.10) para asegurar una asignación metabólica inequívoca.

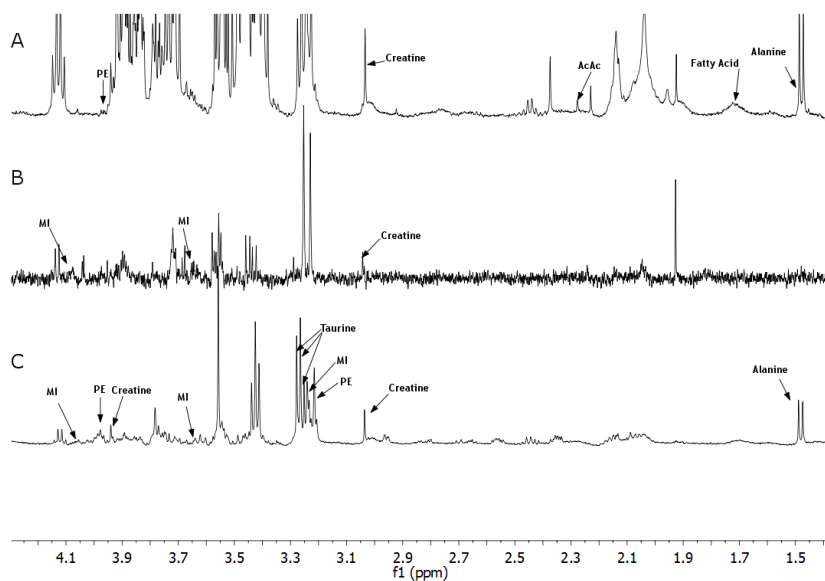


Figura 5.8: Espectro ^1H RMN representativo de suero (A), BAL (B) y tejido pulmonar (C) de ratas septicémicas (los animales control muestran espectros similares). Los metabolitos significativos aparecen etiquetados.

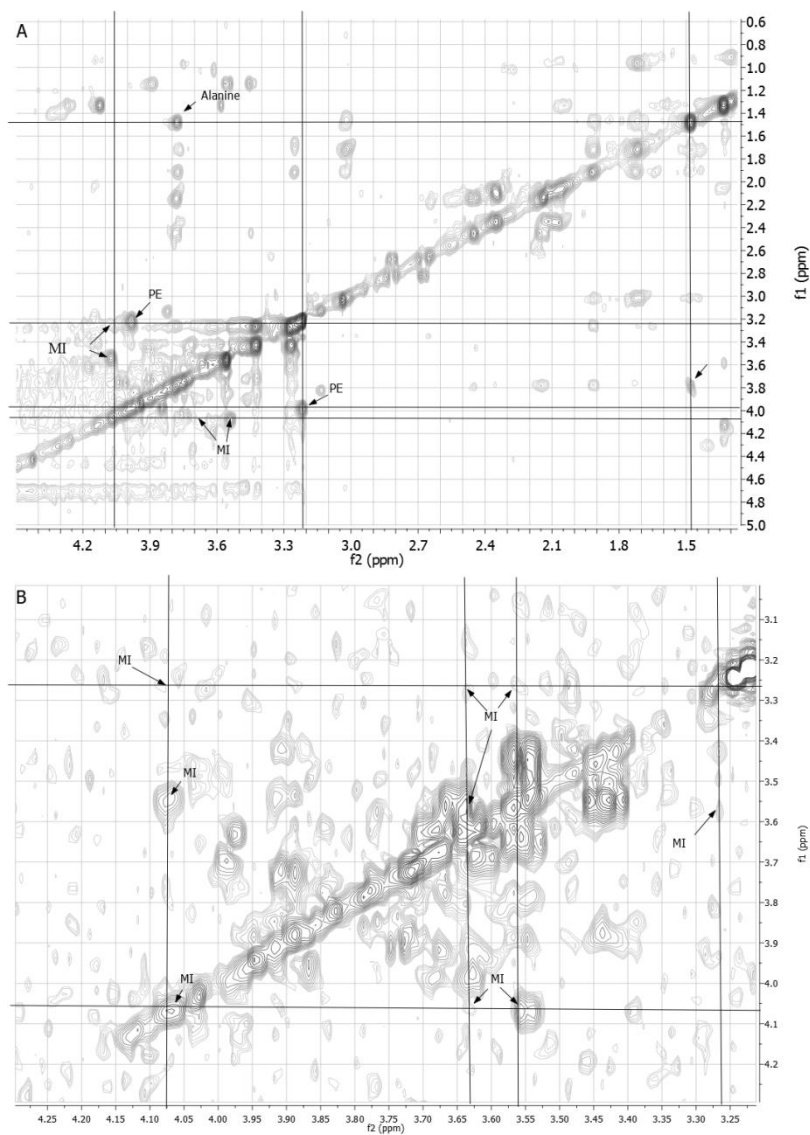


Figura 5.9: Espectros bidimensionales representativos destacando las asignaciones metabólicas cruzadas. A) Espectro TOCSY del tejido pulmonar; B) Espectro COSY del fluido BAL.

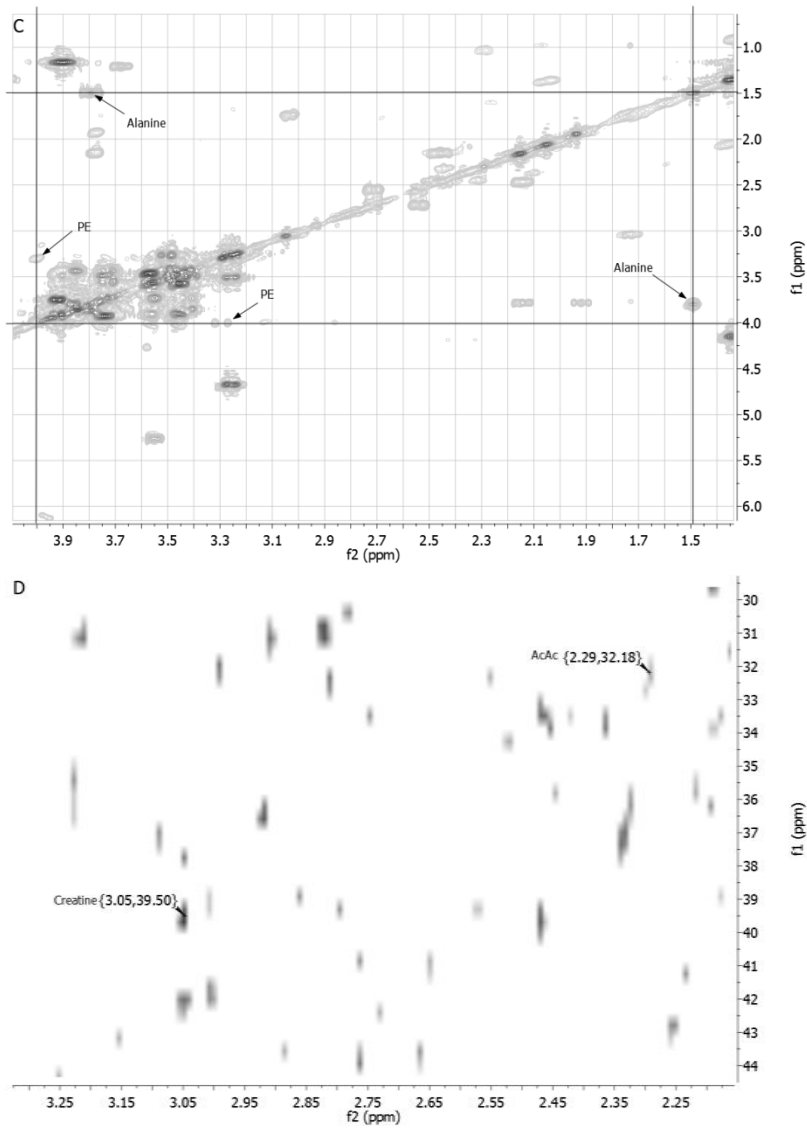


Figura 5.10: Espectros bidimensionales representativos destacando las asignaciones metabólicas cruzadas. C) Espectro COSY de suero sanguíneo; D) Espectro HSQC de suero sanguíneo.

En la tabla 5.2 se muestra la asignación metabólica de los desplazamientos químicos destacados. Como se puede observar, las ratas septicémicas presentan concentraciones elevadas de creatina en el tejido pulmonar, fluido BAL y muestras de suero; alanina y fosfoetanolamina en tejido pulmonar y muestras de suero; acetoacetato y un ácido graso específico en las muestras de suero. Por el contrario, las ratas septicémicas muestran concentraciones bajas de formateo en las muestras de suero. Finalmente, los niveles de mioinositol se encontraron elevados en el tejido pulmonar y disminuidos en las muestras de fluido BAL.

Muestra	Bucket (ppm)	Metabolito postulado	Intensidad relativa		P-value
			Control	Sepsis	
Tejido pulmón	1.51	Alanina	18.26 ± 0.30	24.96 ± 0.51	3.20e-05
	3.04	Creatina	14.09 ± 0.13	18.85 ± 0.17	2.91e-06
		Mioinositol +			
	3.23	Fosfoetanolamina + Taurine	35.25 ± 0.19	44.63 ± 0.22	3.28e-04
	3.67	Mioinositol	4.14 ± 0.08	5.25 ± 0.08	3.34e-03
	3.96	Creatina	7.87 ± 0.05	10.80 ± 0.09	5.47e-06
	3.99	Fosfoetanolamina	5.54 ± 0.03	7.91 ± 0.03	3.86e-07
Fluido BAL	4.03	Mioinositol	1.43 ± 0.03	2.10 ± 0.04	2.04e-04
	4.06	Mioinositol	8.45 ± 0.11	5.11 ± 0.09	3.24e-04
	3.08	Creatina	2.93 ± 0.07	4.59 ± 0.07	2.44e-03
	3.63	Mioinositol	4.59 ± 0.03	3.34 ± 0.02	2.45e-03
Suero	1.53	Alanina	8.11 ± 0.1	12.46 ± 0.12	9.45e-05
	1.72	Ácido graso	0.50 ± 0.01	0.85 ± 0.01	1.31e-06
	1.80	Ácido graso	0.70 ± 0.01	1.20 ± 0.02	4.79e-05
	2.00	No identificado	1.03 ± 0.01	1.59 ± 0.01	4.32e-09
	2.27	Acetoacetate	0.34 ± 0.01	1.81 ± 0.02	6.81e-05
	3.06	Creatina	5.98 ± 0.06	12.09 ± 0.09	5.72e-07
	4.00	Fosfoetanolamina	2.81 ± 0.02	6.19 ± 0.03	1.45e-09
	8.48	Formate	0.69 ± 0.01	0.39 ± 0.01	5.27e-05

Tabla 5.2: Sumario de los metabolitos postulados para las regiones significativas destacadas por los PCAs, con las intensidades relativas medias (media ± SD) de los dos grupos y su significancia (p-value).

EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA MEDIANTE PLS-DA

Basándonos en los resultados positivos de los PCAs para separar los grupos control y sepsis, desarrollamos una serie de modelos diagnósticos de sepsis experimental. Usando los desplazamientos químicos seleccionados con anterioridad, se aplicó un PLS-DA para investigar las diferencias significativas entre ambos grupos para cada clase de muestra y se desarrollo un modelo multi-muestra PLS-DA para la diagnosis de la sepsis usando todos los biomarcadores potenciales detectados en las muestras no invasivas, fluido BAL y suero. Los modelos PLS-DA fueron entrenados con 6 muestras control y 6 septicémicas, siendo validados con otras 7 muestras control y 6 septicémicas. Tres componentes PLS fueron seleccionadas para construir el modelo (tabla 5.3).

Modelo	Predicción Sepsis	Sensibilidad	Especificidad
Tejido Pulmonar	93.93 ± 7.07%	100 ± 0%	94.7 ± 6.2%
BAL	84.00 ± 11.91%	90.9 ± 8.4%	87.8 ± 8.5%
Suero	100 ± 0%	100 ± 0%	100 ± 0%
BAL+Suero	100 ± 0%	100 ± 0%	100 ± 0%

Tabla 5.3: Resultados de clasificación de las ratas septicémicas usando los diferentes modelos predictivos. Los modelos fueron contruidos con 6 animales de cada grupo seleccionados aleatoriamente y validado con otros 13 animales diferentes (7 controles y 6 septicémicos). Los modelos fueron contruidos de forma aleatoria 100 veces. Los resultados se expresan con media ± SD.

4. Discusión.

En este estudio se presenta por vez primera un modelo diagnóstico de sepsis desarrollado a través de una combinación de diferentes muestras biológicas, obteniendo un éxito de clasificación del 100%. Así mismo nuestros análisis muestran como la concentración de ciertos metabolitos endógenos, entre los que se encuentran la alanina, creatina, fosfoetanolamina, mioinositol y el formato, cambia significativamente en las muestras de tejido pulmonar, fluido BAL y suero de ratas con sepsis.

El diagnóstico precoz de la sepsis se ha convertido en un principio crucial en el tratamiento de la enfermedad. En los últimos años se han efectuado remarcables esfuerzos en la búsqueda de expresiones moleculares distintivas con el fin de desarrollar aproximaciones eficientes para el diagnóstico precoz y prognosis de la enfermedad [15]. Diversas proteínas del plasma han sido propuestas para la diagnosis de la sepsis [16], pero estas proteínas carecen de la suficiente sensibilidad y especificidad como para ser considerados biomarcadores de la enfermedad. En este punto, una aproximación metabonómica mediante RMN se propone como herramienta válida para el diagnóstico de la sepsis.

En el presente estudio, el análisis metabonómico mostró como la concentración de determinados metabolitos característicos variaban significativamente en el modelo de sepsis en comparación con las ratas control. Las concentraciones de alanina, creatina, fosfoetanolamina y mioinositos se incrementaron en el tejido pulmonar de los animales con sepsis. Las concentraciones de creatina y mioinositol se incrementaron y disminuyeron respectivamente en el fluido BAL de los animales enfermos. Y finalmente las concentraciones de alanina, creatina, fosfoetanolamina, acetoacetato y dos ácidos grasos no identificados se incrementaron en las muestras de suero sanguíneo, mientras que la concentración del formato disminuyó en las mismas.

A pesar de que la señal de la taurina aparece como un identificable componente del bucket 3.23ppm del tejido pulmonar, este metabolito ha sido descartado como biomarcador debido a que las

intensidades de las otras señales de la taurina a lo largo del espectro no presentaban variaciones significativas entre ratas control y septicémicas. De esta forma, los cambios de intensidad en el bucket 3.23 se atribuyeron a los cambios de concentración de los metabolitos mioinositol y fosfoetanolamina también presentes en el bucket.

La identificación de un patrón metabólico de la sepsis con la suficiente sensibilidad y especificidad presenta implicaciones patofisiológicas además de las diagnósticas mencionadas. La identificación de la función metabólica de los compuestos químicos encontrados conlleva un mayor entendimiento de la propia patofisiología de la sepsis. El incremento de las concentraciones de alanina en las muestras de tejido pulmonar y suero de las ratas enfermas son resultado presumiblemente de un aumento del metabolismo del piruvato, y transaminación de la alanina vía el ciclo de Cori, como previamente ha sido encontrado en la sepsis [17].

La creatina es un ácido nitrogenado orgánico envuelto en la degradación proteica muscular y en el suplemento energético de los músculos. Ante una respuesta inflamatoria, la concentración de este metabolito se incrementará debido a la destrucción muscular y a la rabdomiolisis [18]. En consecuencia, la concentración de este metabolito se incrementará significativamente en ratas con sepsis.

Durante la sepsis, el hígado puede transformar la glucosa redundante en ácidos grasos y lípidos. Al mismo tiempo, la grasa almacenada es también movilizada y oxidada como principal fuente calórica. La fosfoetanolamina es un metabolito fosfomonoéster involucrado en el metabolismo de los fosfolípidos. La fosfoetanolamina es un precursor de la síntesis de los fosfolípidos y un producto de la ruptura de los mismos. Un incremento en los niveles de fosfoetanolamina como el detectado en nuestro análisis, es indicativo de la degradación de fosfolípidos acorde con los requerimientos energéticos durante la sepsis, sugiriendo daño celular y posible apoptosis [19].

El incremento de los niveles de acetoacetato podría estar relacionado con el aumento de la oxidación de los ácidos grasos en las ratas con sepsis. Como principal fuente de energía, la oxidación de los ácidos grasos aumenta significativamente para cubrir los requerimientos energéticos [20], y consecuentemente se incrementarán y acumularán los

productos de la oxidación de los ácidos grasos, principalmente los cuerpos cetónicos. Se espera que deficiencias en uno o más niveles de la fosforilación oxidativa altere sustancialmente el estado redox de la mitocondria, frenando efectivamente la entrada de acetil-CoA en el ciclo del ácido tricarboxílico, pudiéndose dar lugar a una acumulación de acetil-CoA citosólico. Este efecto se ve agravado por la conversión del citrato en acetil-CoA por la enzima ATP citrato liasa, un efecto que contribuirá al incremento de acetoacetato en el plasma [21].

El formato es una alternativa potencial como fuente de un único carbono para la producción de N5, N10- Metilentetrahidrofolato, requerido en la biosíntesis de ácidos nucleicos [21]. Los niveles de formato en el suero decrecen significativamente en las ratas con sepsis como resultado del incremento del consumo del mismo para satisfacer la biosíntesis de nucleótidos con base de purina durante la sepsis.

El mioinositol juega un papel crítico en la cascada de transducción de señales en la contracción del músculo liso vascular y está implicado en la inducción de endotoxinas provocando la hipocontractilidad del músculo liso vascular [22].

Nuestro estudio confirma y completa trabajos previos sobre cambios metabólicos durante la sepsis experimental [5, 6]. En el análisis de las muestras de suero procedentes de ratas septicémicas por LC-MS fueron identificados seis ácidos grasos como posibles biomarcadores [6]. Sin embargo, metabolitos de bajo peso molecular no pudieron ser identificados por esta técnica. En un estudio posterior [5] mediante espectroscopia ^1H -RMN fueron detectados cambios significativos en la concentración de diversos metabolitos involucrados en el metabolismo energético en las muestras de suero de ratas septicémicas, entre los que se encontraban el lactato, alanina, acetato, acetoacetato, ácido hidroxibutírico y formato. Usando estos metabolitos, se desarrolló un modelo diagnóstico con un éxito de predicción del 87%.

Puesto que la sepsis está caracterizada por una respuesta inflamatoria sistémica, nuestra investigación se ha enfocado en la búsqueda de las alteraciones metabólicas globales en diferentes muestras a través del análisis de los perfiles espectroscópicos de RMN en diversas muestras biológicas. Los resultados de los PCAs muestran las diferencias en los

perfiles metabólicos de ratas control y septicémicas en muestras biológicas diferentes al suero, como son el tejido pulmonar o el fluido BAL. Los modelos predictivos desarrollados basados en cada clase de muestras muestran un éxito en el diagnóstico similar o superior a los previamente publicados [5]. A través de la espectroscopía HR-MAS y un PLS-DA, la capacidad predictiva del modelo BAL+Suero fue del 100% de éxito.

La fuerza de nuestro trabajo se basa en la descripción de los cambios metabólicos en otras muestras diferentes al suero y el desarrollo de un modelo diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad. La identificación de biomarcadores moleculares en diferentes muestras abre un excitante camino para entender la patofisiología específica de la sepsis, como el comportamiento de los distintos metabolitos según la muestra analizada. Por ejemplo, el metabolismo energético presenta diferentes tendencias metabólicas según la muestra analizada. A pesar de que el mecanismo de interconexión sigue siendo especulativo, los resultados que confirman la correlación del metaboloma de las diferentes muestras avalan la aplicación de este método para el estudio de los cambios metabólicos y diagnóstico de la sepsis.

En resumen, nuestro estudio proporciona una aproximación metabonómica para la evaluación diagnóstica de la sepsis, con una especificidad del 100%, basada en la información integral de los metabolitos del tejido pulmonar, el fluido BAL y el suero sanguíneo.

5. Referencias.

1. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Penuelas O, Lorente JA, Gordo F, Honrubia T, Algora A, Bustos A, Garcia G, Diaz-Reganon IR, de Luna RR. Sepsis incidence and outcome: Contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Critical Care Medicine* 2007; 35(5): 1284-1289.
2. Vesteinsdottir E, Karason S, Sigurdsson SE, Gottfredsson M, Sigurdsson GH. Epidemiology of Severe Sepsis and Septic Shock in Intensive Care Units. Results of a Prospective, Nationwide Study during One Year. *Intensive Care Medicine* 2010; 36: S311-S311.
3. Ferrer R, Artigas A, Levy MM, Blanco J, Gonzalez-Diaz G, Garnacho-Montero J, Ibanez J, Palencia E, Quintana M, de la Torre-Prados MV, Grp ES. Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2008; 299(19): 2294-2303.
4. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis (vol 39, pg 206, 2004). *Clinical Infectious Diseases* 2005; 40(9): 1386-1388.
5. Zhong-ying L, Ping-bo X, Shi-kai Y, Hai-bing M, Gen-jin Y, Wei-xing D, Xin-ru L, Jin-bao L, Xiao-ming D, Wei-dong Z. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis by ^1H NMR and pattern recognition. *NMR Biomed* 2009; 601-608.
6. Xu PB, Lin ZY, Meng HB, Yan SK, Yang Y, Liu XR, Li JB, Deng XM, Zhang WD. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis. *Journal of Infection* 2008; 56(6): 474-481.
7. Nin N, Lorente JA, Fernandez-Segoviano P, De Paula M, Ferruelo A, Esteban A. High-Tidal Volume Ventilation Aggravates Sepsis-Induced Multiorgan Dysfunction in a Dexamethasone-Inhibitable Manner. *Shock* 2009; 31(4): 429-434.

8. Xi Y, Rocke DM. Baseline correction for NMR spectroscopic metabolomics data analysis. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 324.
9. Holmes E, Foxall PJD, Nicholson JK, Neild GH, Brown SM, Beddell CR, Sweatman BC, Rahr E, Lindon JC, Spraul M, Neidig P. Automatic Data Reduction and Pattern Recognition Methods for Analysis of ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Human Urine from Normal and Pathological States. *Analytical Biochemistry* 1994; 220(2): 284-296.
10. Ding B, Gentleman R. Classification Using Generalized Partial Least Squares. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 2005; 14(2): 280-298.
11. Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, Llacer JL, Piotto M, Assemet O, Celda B. ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed* 2004; 17(4): 191-205.
12. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 2000; 13(3): 129-153.
13. Sitter B, Sonnewald U, Spraul M, Fjosne HE, Gribbestad IS. High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue. *NMR Biomed* 2002; 15(5): 327-337.
14. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, Hau DD, Psychogios N, Dong E, Bouatra S, Mandal R, Sinelnikov I, Xia J, Jia L, Cruz JA, Lim E, Sobsey CA, Shrivastava S, Huang P, Liu P, Fang L, Peng J, Fradette R, Cheng D, Tzur D, Clements M, Lewis A, De Souza A, Zuniga A, Dawe M, Xiong Y, Clive D, Greiner R, Nazyrova A, Shaykhutdinov R, Li L, Vogel HJ, Forsythe I. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(Database issue): D603-610.
15. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Braun GG, Radespiel-Troeger M. Predictive value of procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein for survival in postoperative patients with severe sepsis. *Journal of Critical Care*: In Press, Corrected Proof.

16. Schuetz P, Christ-Crain M, MÃ¼ller B. Biomarkers to improve diagnostic and prognostic accuracy in systemic infections. *Current Opinion in Critical Care* 2007; 13(5): 578-585
510.1097/MCC.1090b1013e3282c1099ac1092a.

17. Gore DC, Jahoor F, Hibbert J, DeMaria EJ. Except for Alanine, Muscle Protein Catabolism Is Not Influenced by Alterations in Glucose Metabolism During Sepsis. *Arch Surg* 1995; 130(11): 1171-1177.

18. Bolton CF. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: neuromuscular manifestations. *Crit Care Med* 1996; 24(8): 1408-1416.

19. Vulimiri SV, Misra M, Hamm JT, Mitchell M, Berger A. Effects of Mainstream Cigarette Smoke on the Global Metabolome of Human Lung Epithelial Cells. *Chem Res Toxicol* 2009.

20. Mervyn S, Vincenzo De S, Domenico V, William J. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet* 2004; 364(9433): 545-548.

21. McClay JL, Adkins DE, Isern NG, O'Connell TM, Wooten JB, Zedler BK, Dasika MS, Webb BT, Webb-Robertson BJ, Pounds JG, Murrelle EL, Leppert MF, van den Oord E. H-1 Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics Analysis Identifies Novel Urinary Biomarkers for Lung Function. *J Proteome Res*: 9(6): 3083-3090.

22. Sotoda Y, Negoro M, Wakabayashi I. Involvement of decreased myo-inositol transport in lipopolysaccharide-induced depression of phosphoinositide hydrolysis in vascular smooth muscle. *FEBS Lett* 2002; 519(1-3): 227-230.

Capítulo 6

Aproximación metabonómica para la evaluación del daño pulmonar inducido por ventilación mecánica

Al igual que en la evaluación diagnóstica de la sepsis experimental, en la actualidad no existen biomarcadores moleculares indicativos del deterioro celular en procesos de daño pulmonar agudo. La estrategia propuesta para la detección de biomarcadores de sepsis mediante el análisis metabonómico por RMN de muestras de suero, tejido y lavado bronqueo-alveolar (BAL) se muestra como una herramienta diagnóstica potencial de diversas condiciones pulmonares, como es el caso del daño pulmonar por ventilación mecánica.

El análisis de componentes principales (PCA) demostró alteraciones del perfil metabólico de las muestras de tejido y BAL de los animales sometidos a una estrategia de ventilación con alto volumen inspiratorio, donde los metabolitos destacados se encontraban involucrados en el metabolismo energético, en el ciclo del colágeno y en desarrollo y mantenimiento del surfactante pulmonar. Así mismo, no se detectaron cambios apreciables en el perfil metabólico de las muestras de suero. Seleccionando los metabolitos destacados por los análisis previos, se construyó un modelo diagnóstico de mínimos cuadrados parciales (PLS) con un éxito en el diagnóstico del 100%.

Con los resultados recogidos en el presente capítulo se ha preparando un manuscrito enviado para su publicación a la American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, estando al cierre de esta tesis en estado de revisión.

1. Introducción.

El síndrome del distrés respiratorio (SDR) está caracterizado por una inflamación pulmonar y el desarrollo de edema pulmonar. Está documentado que ciertas estrategias de ventilación mecánica caracterizadas por el uso de un alto volumen tidal (V_T) y una baja presión positiva telespiratoria (PEEP) incrementan el daño pulmonar y provocan un inflamación sistémicas [1] (daño pulmonar inducido por ventilación mecánica, VILI) en pacientes sometidos a este tipo de ventilación. Asimismo, una estrategia de ventilación con un V_T bajo (6ml/kg) frente a un V_T alto (12 ml/kg) en pacientes con SDR o daño pulmonar agudo (ALI), conduce a una disminución de la mortalidad [2]. Curiosamente, la menor tasa de mortalidad de los pacientes ventilados con V_T bajo frente a los ventilados con V_T alto no viene motivado por cambios en las diversas funciones pulmonares (por ejemplo el intercambio de gases fue similar en ambos grupos), sino por una aceleración del fallo orgánico y de la entrada en shock [2]. Por lo tanto, se cree que el daño tisular producido por el trauma ventilatorio persiste en los pacientes con ALI/SDR.

Sin embargo, el diagnóstico del SDR o del ALI se basa en la presencia de criterios no específicos, como parámetros fisiológicos o radiológicos [3]. De esta forma continúa la necesidad de encontrar biomarcadores de SDR/ALI que permitan un diagnóstico y tratamiento temprano de la enfermedad. Al igual que en el caso de la sepsis clínica, han sido propuesto expresiones proteicas anormales como marcadores de la enfermedad sin la suficiente sensibilidad [4].

En el presente capítulo proponemos el análisis metabonómico por RMN de muestras de suero sanguíneo, tejido pulmonar y BAL, como herramienta para la detección de biomarcadores moleculares del VILI experimental que permitan desarrollar modelos para el diagnóstico y evaluación del daño pulmonar por ventilación mecánica.

2. Métodos.

PREPARACIÓN DEL ANIMAL Y PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El protocolo experimental fue llevado a cabo acorde con las líneas del Comité de Investigación Animal del Hospital Universitario de Getafe. En el estudio fueron utilizadas ratas macho Sprague Daly (300-350g) aclimatadas a ciclos de día/noche de 12 horas y alimentadas con pienso Purina. Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una dosis de diazepam (5 mg/kg) y ketamina (90 mg/kg). Posteriormente se realizaron inyecciones adicionales (ketamina 30 mg/kg, diazepam 2 mg/kg) para mantener a los animales adaptados al ventilador. Se practico una traqueotomía quirúrgica y se colocó una cánula de calibre 14 para conectar al animal con el ventilador mecánico (Babylog 8000 Plus Dräger, Alemania). Además, con el fin de monitorizar la presión sanguínea arterial (Hewlett Packard, Modelo 66S, Ginebra, Suiza) fue insertado un catéter de calibre 20 en la arteria carótida izquierda. La temperatura corporal se mantuvo estable durante el experimento colocando a los animales sobre un termopad (Challomer Marketing Ltd., Inglaterra).

El protocolo experimental fue llevado a cabo mediante dos estrategias de ventilación mecánica: ventilación a V_T bajo ($V_T = 9$ mL/kg, PEEP= 5 cm H_2O) que servirá como grupo control ($n=14$) y ventilación a V_T alto ($V_T = 25$ mL/kg, cero PEEP) que servirá como grupo tratado ($n=12$). Para ambos grupos se mantuvo un ritmo respiratorio de 70 respiraciones por minuto, un tiempo de inspiración de 0.3s, tiempo de expiración 0.56s y una concentración de oxígeno en aire inspirado (FiO_2) de 0.45.

Tras la monitorización del animal descrita arriba, los animales fueron sometidos a un periodo de aclimatación de 10 minutos usando los parámetros de ventilación del grupo control. Tras estos 10m, los animales fueron asignados aleatoriamente a una de las dos estrategias de ventilación.

MEDIDAS

Se realizaron medidas de presión media arterial (MAP) y de los parámetros de la ventilación mecánica (Pico de presión de la vía aérea [P_{aw}], V_T , y compliancia dinámica del sistema respiratorio [C_{RS}]) cada 30 minutos hasta un tiempo final de 150 minutos. Se extrajeron muestras de sangre para la determinación de las concentraciones de gases y lactato en la sangre arterial al inicio y al final del experimento. Al final del experimento, los animales fueron sacrificados por exsanguinación. El suero sanguíneo fue inmediatamente congelado para la determinación de actividades de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), creatinkinasa (CK), la concentración de urea en suero (LDH; Integra 700) y los estudios metabonómicos.

Se realizó un lavado bronqueo-alveolar (BAL) mediante la instilación de 10 ml de salino, del que se recuperó entre 5 y 7 ml. Las muestras de fluido de BAL fueron congelada a -80°C para el posterior análisis metabonómico. Finalmente se abrió la caja torácica para extirpar los pulmones. El pulmón izquierdo se extrajo expandiéndolo con una instilación intratraqueal de 10% de formaldehído con una presión de 20 cm de agua para análisis histológicos similares a los descritos en el capítulo 6. El pulmón derecho fue inmediatamente congelado para análisis metabonómicos.

Las muestras extraídas fueron analizadas por espectroscopía de resonancia magnética mediante protocolos similares a los descritos en el sección 6.2.

PROCESADO ESPECTRAL

Se excluyeron del análisis las regiones de desplazamiento químico entre 5.00-5.20 ppm y entre 0-0.04, para eliminar la señal residual del agua y de la referencia interna (TSP). Los espectros fueron procesados mediante el paquete "Metabonomic": corrección de la línea base mediante el método Roche & Xi [5], integración en "buckets" de $\delta 0.01$ ppm para los espectros de BAL y de $\delta 0.04$ ppm en los espectros de tejido y suero y normalización por la suma total de todas las regiones espectrales.

Los datos espectrales fueron analizados mediante técnicas de estadística multivariante (PCA y PLS-DA) con un procedimiento similar al descrito en el capítulo 6.2. Así mismo se midió la asociación entre las intensidades de los metabolitos postulados como biomarcadores con los niveles del pico de presión inspiratoria (PIP), la presión de oxígeno arterial (PaO_2) a 150m y los resultados de los análisis histológicos, mediante un análisis de correlación de Spearman.

3. Resultados.

EFFECTOS DE LA VENTILACIÓN MECÁNICA

Las ratas ventiladas con un alto V_T muestran un incremento significativo del P_{aw} con el tiempo, así como un descenso significativo en los niveles de PaO_2 y MAP (tabla 6.1). La ventilación mecánica al alto V_T aparece también asociada con acidosis sistémica, hiperlactatemia e incrementos de LDH, creatinquinasa y actividades de AST y ALT en suero (tabla 6.1 y 6.2).

		t=0 min	t=150 min	Incremento	p-value
PaO₂ (mmHg)	Control	175.4 ± 2.6	183.3 ± 2.2	8.2 ± 3.4	0.04
	VILI	164.2 ± 4.9	133.2 ± 22.6	-31.1 ± 23.6	
MAP (mmHg)	Control	120 ± 4.2	93.1 ± 2.9	-27.5 ± 3.8	0.01
	VILI	127.2 ± 5.2	80.8 ± 3.3	-46.4 ± 4.7	
PIP (cm H₂O)	Control	16.4 ± 0.5	17.4 ± 0.3	1.5 ± 0.2	0.001
	VILI	26.4 ± 1.9	33.5 ± 3.3	8.6 ± 2.2	
HCO₃⁻ (mmol/L)	Control	16.4 ± 0.4	16.3 ± 0.5	-0.8 ± 0.3	0.5
	VILI	17.5 ± 0.5	16.6 ± 0.4	-0.4 ± 0.5	
Lactato (mmol/L)	Control	2.6 ± 0.2	0,9 ± 0,7	-1.7 ± 0.2	0.07
	VILI	2.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1	-1.1 ± 0.2	

Tabla 6.1: Resultados hemodinámicos, gases en sangre y variables bioquímicas en animales control y con VILI. Los parámetros de gases en sangre se refieren a sangre arterial. MAP, presión arterial media; PIP, pico de presión inspiratoria. p value entre el incremento del grupo control frente al grupo VILI. Los resultados están expresados como media ± SEM.

	Control	VILI	p-value
Creatinkinasa (IU/L)	665.3 ± 107.4	1124.4 ± 131.3	0.02
Suero LDH (IU/L)	343.6 ± 37.4	936.4 ± 176.8	0.002
Suero AST (IU/L)	83.8 ± 5.6	173.4 ± 32.6	0.01
Suero ALT (IU/L)	33.6 ± 2.3	58.4 ± 12.1	0.03
Glucosa (mmol/L)	110.0 ± 6.3	127.5 ± 12.3	0.2
Suero urea (mmol/L)	50.0 ± 3.6	45.4 ± 3.3	0.3
Creatinine (mg/dL)	0.59 ± 0.03	0.61 ± 0.06	0.7
LIS (AU)	0.0 ± 0.0	23.4 ± 7.1	0.001

Tabla 6.2: Variables bioquímicas y resultados del daño pulmonar (lung injury score [LIS]) de los grupos control y VILI. LDH, lactato deshidrogenasa; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa. Los resultados están expresados como media ± SEM.

RESULTADOS HISTOLÓGICOS

El análisis mediante microscopio óptico no mostró anomalías en los pulmones del grupo control. El análisis de los pulmones de las ratas ventiladas a un alto V_T mostraron congestión capilar, edema intersticial necrosis neumocítica tipo I y formación de membrana hialina cubriendo la superficie epitelial (figura 6.1). La media del resultado de daño pulmonar fue de 0.0 ± 0.0 para el grupo control y 23.4 ± 7.1 (p -value=0.001) para el grupo VILI.

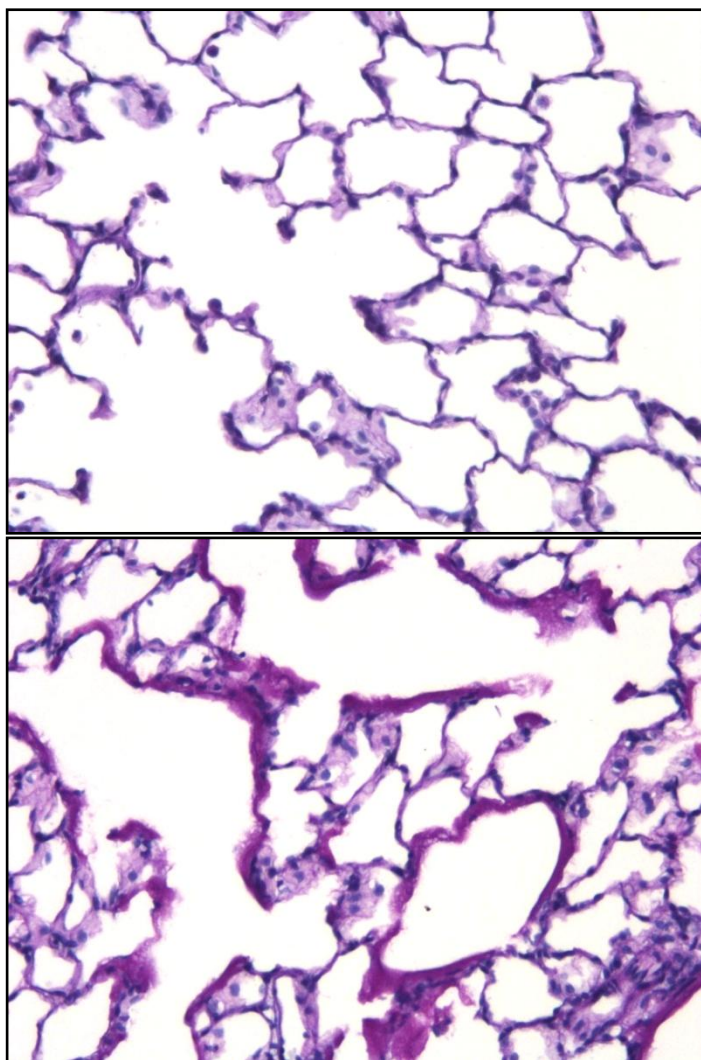


Figura 6.1: Fotografía microscópica (microscopio óptico, hematoxilina-eosina X20) de los cortes de pulmón representativos de los grupos control (imagen superior) y VILI (imagen inferior).

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES E IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES

Los análisis de componentes principales de las muestras de tejido pulmonar (figura 6.2) y fluido BAL (figura 6.3) muestran una clara discriminación entre los dos grupos a través del primer componente principal (PC1). Por el contrario, el PCA sobre los espectros del suero no mostraron ninguna discriminación entre los dos grupos de muestras a lo largo de las 5 primeras componentes principales.

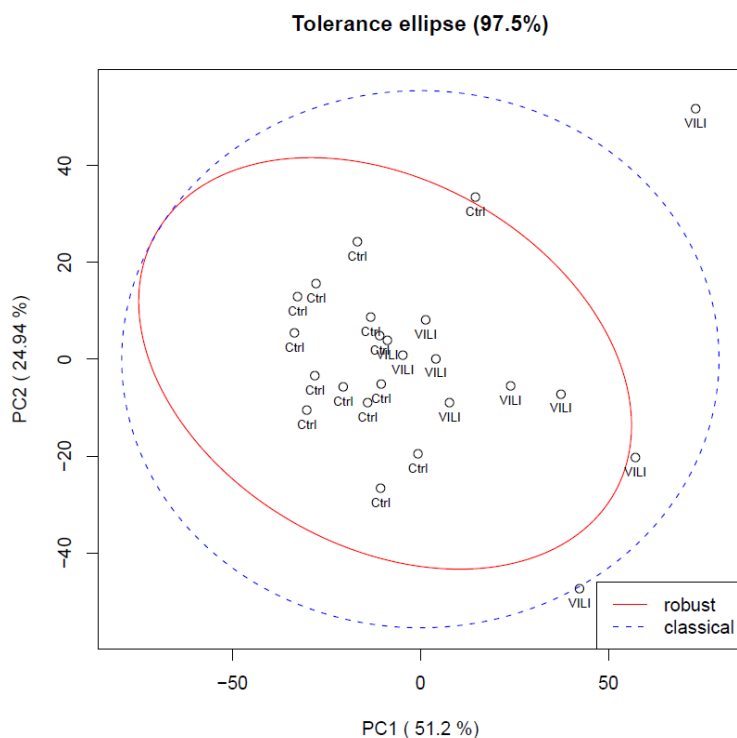


Figura 6.2: Gráfica de scores del PCA de los espectros ^1H RMN de tejido pulmonar. Se aprecia como las componentes principales 1 y 2 diferencian claramente los grupos control (Ctrl) y VILI.

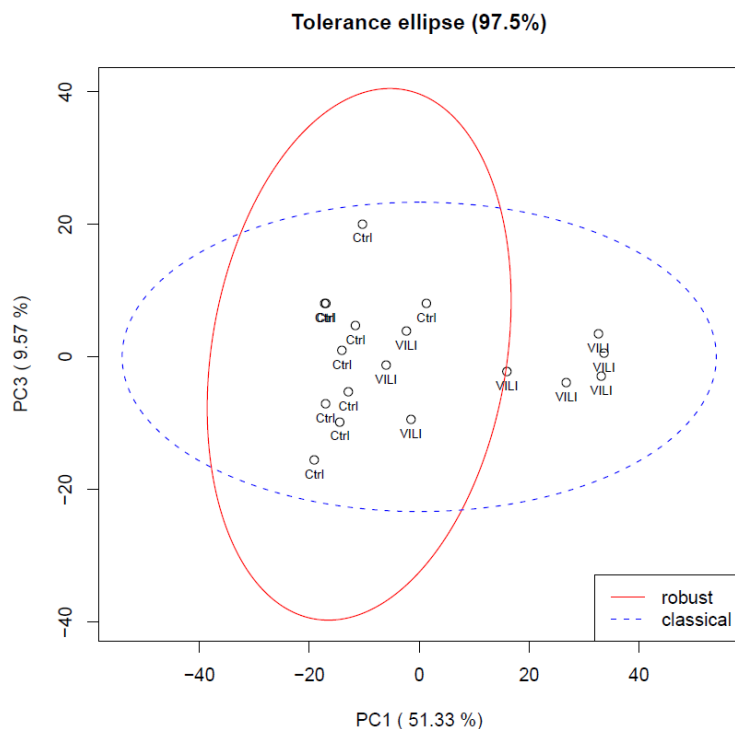
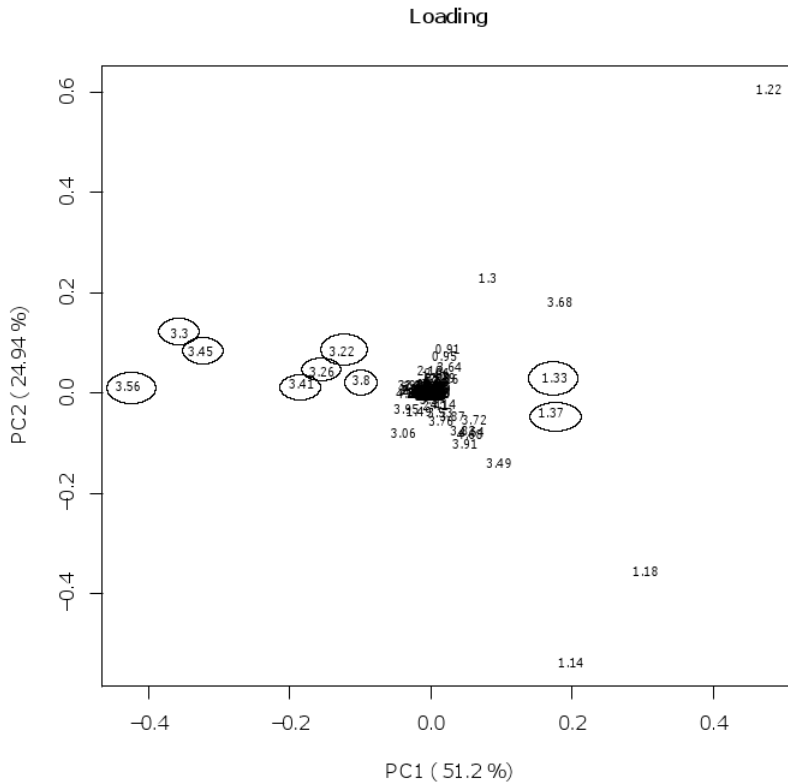
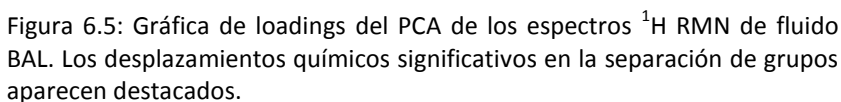


Figura 6.3: Gráfica de scores del PCA de los espectros ^1H RMN de fluido BAL. Se aprecia como las componentes principales 1 y 3 diferencia claramente los grupos control (Ctrl) y VILI

Analizando las gráficas de loadings de los PCAs de las muestras de tejido pulmonar (figura 6.4) y BAL (figura 6.5) podemos observar las variables más significativas para explicar la varianza del conjunto.





Con el fin de clarificar la gráfica de loadings del PCA de las muestras de BAL (figura 6.5), se realizó un análisis de coeficientes de regresión PLS (figura 6.6), donde los potenciales biomarcadores fueron seleccionados mediante un test T^2 de Hotelling.

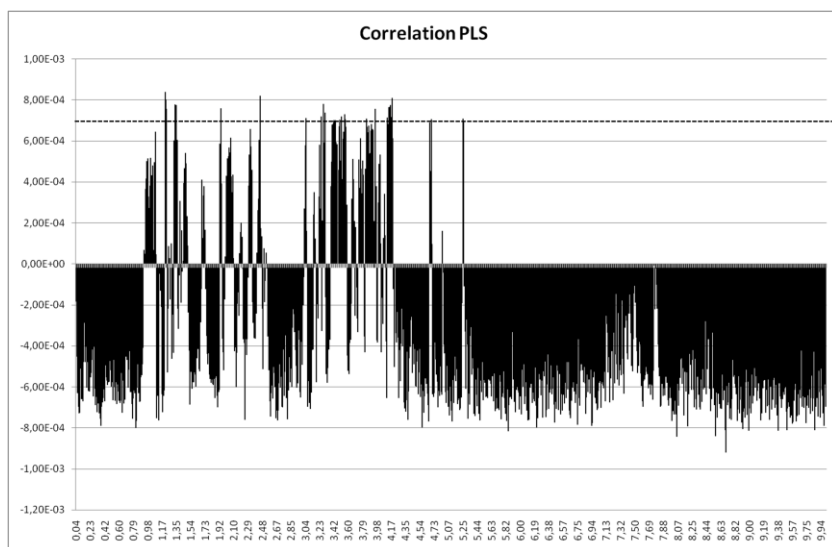


Figura 6.6: Análisis de coeficientes de regresión PLS de los espectros ^1H RMN de suero.

Las figuras 6.7 y 6.8 muestran los espectros representativos del tejido pulmonar y del fluido BAL respectivamente, destacando las principales diferencias metabólicas detectadas por nuestro método. Las señales de resonancia fueron asignadas según la base de datos del proyecto “the Human Metabolome Database”[6] y la identificación de los picos cruzados característicos de los espectros bidimensionales (figuras 6.9 y 6.10) para asegurar una asignación metabólica inequívoca.

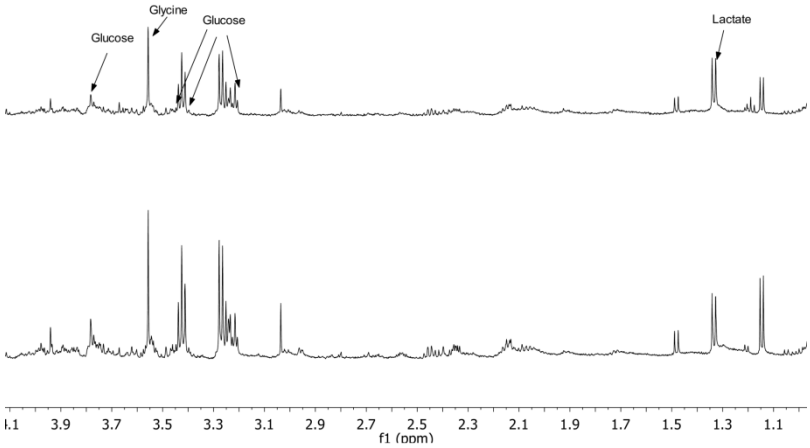


Figura 6.7: Espectros ^1H RMN representativo de muestras de tejido pulmonar de ratas con VILI (superior) y control (inferior). Los metabolitos significativos aparecen etiquetados.

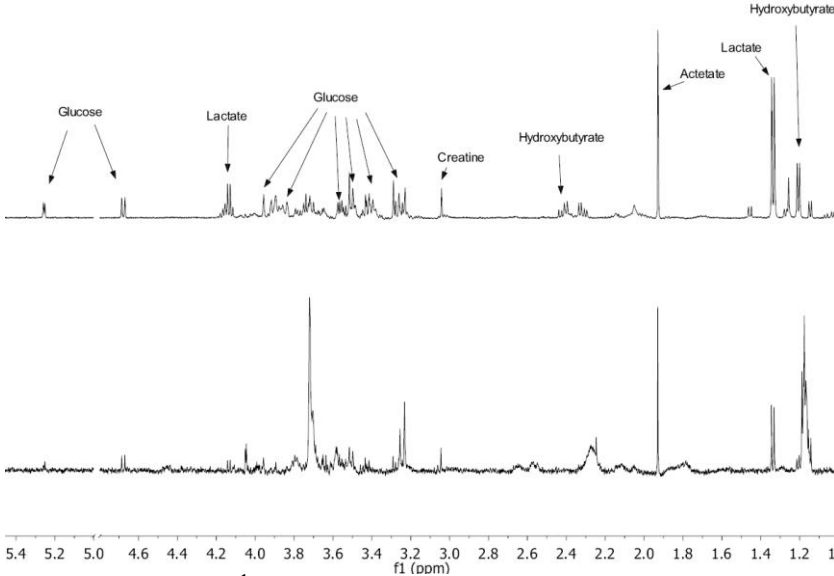


Figura 6.8: Espectros ^1H RMN representativo de muestras de fluido BAL de ratas con VILI (superior) y control (inferior). Los metabolitos significativos aparecen etiquetados.

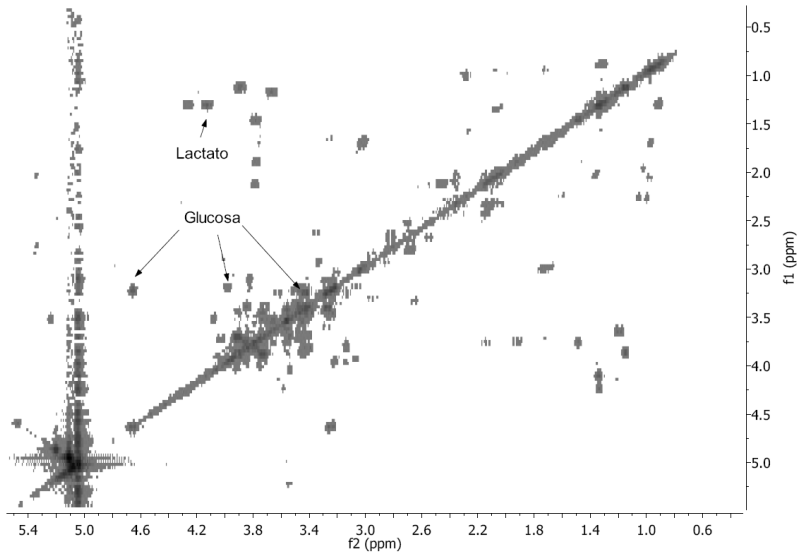


Figura 6.9: Espectro bidimensional COSY representativo del tejido pulmonar destacando las asignaciones metabólicas cruzadas.

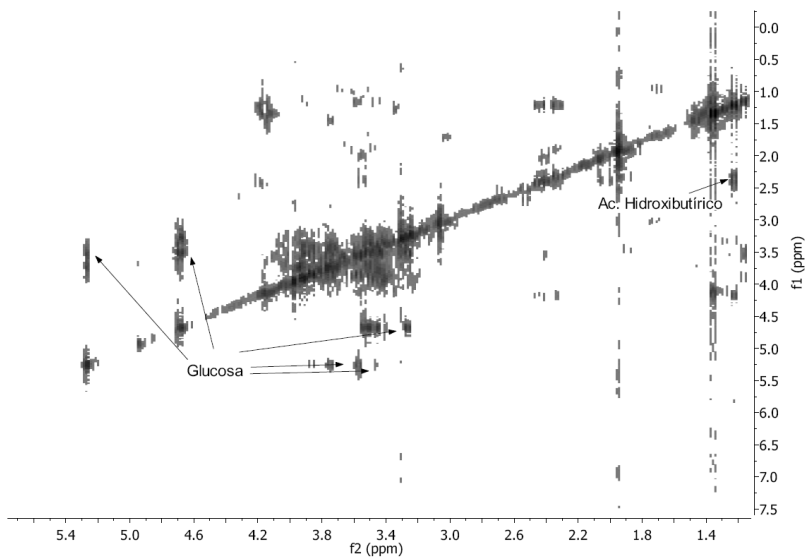


Figura 6.10: Espectro bidimensional COSY representativo del fluido BAL destacando las asignaciones metabólicas cruzadas.

Los desplazamientos químicos junto a las intensidades relativas de los metabolitos identificados se encuentran listados en la tabla 6.3. En ella se puede comprobar cómo el grupo VIII muestra concentraciones superiores de lactato en las muestras de tejido pulmonar y fluido BAL; y de Ac. Hidroxibutírico, acetato y creatina en las muestras de fluido BAL (tabla 6.3, figuras 6.7 y 6.8). Por el contrario, los niveles de glucosa se ven incrementados en el fluido BAL y disminuidos en las muestras de tejido. Finalmente, los niveles de glicina se encuentran disminuidos en las muestras de tejido pulmonar (tabla 6.3, figura 6.7).

Muestra	Bucket (ppm)	Metabolito	Intensidad relativa		P-value
			Control	VILI	
Tejido Pulmonar	1.34	Lactato	42.60 ± 0.38	55.02 ± 0.51	3.60e-07
	1.37	Lactato	36.50 ± 0.25	48.57 ± 0.47	5.76e-07
	3.22	Glucosa	32.23 ± 0.22	27.30 ± 0.22	5.37e-04
	3.26	Glucosa	35.59 ± 0.22	28.47 ± 0.18	3.61e-05
	3.30	Glucosa	72.90 ± 0.45	59.05 ± 0.39	5.64e-04
	3.41	Glucosa	47.19 ± 0.41	38.52 ± 0.33	6.95e-06
	4.45	Glucosa	71.82 ± 0.75	56.34 ± 0.50	2.58e-06
	3.57	Glicina	93.51 ± 0.81	75.81 ± 0.77	4.55e-05
	3.80	Glucosa	22.73 ± 0.36	18.47 ± 0.30	2.44e-04
Fluido BAL	1.20	Ac. Hidroxibutírico	3.38 ± 0.12	11.75 ± 0.20	2.07e-04
	1.22	Ac. Hidroxibutírico	3.14 ± 0.07	11.17 ± 0.15	5.27e-04
	1.23	Ac. Hidroxibutírico	2.57 ± 0.13	8.52 ± 0.51	2.30e-03
	1.33	Lactato	14.05 ± 0.75	45.19 ± 0.90	2.30e-04
	1.35	Lactato	14.11 ± 0.81	45.23 ± 0.92	2.47e-04
	1.94	Acetato	11.45 ± 0.71	55.20 ± 0.89	1.74e-03
	2.45	Ac. Hidroxibutírico	0.58 ± 0.01	1.80 ± 0.02	1.20e-04
	3.05	Creatina	3.15 ± 0.11	8.65 ± 0.15	4.09e-03
	3.25	Glucosa	1.64 ± 0.26	4.59 ± 0.39	5.04e-03
	3.28	Glucosa	1.46 ± 0.12	5.22 ± 0.27	1.38e-03
	3.30	Glucosa	2.70 ± 0.31	8.95 ± 0.51	2.82e-03
	3.42	Glucosa	1.67 ± 0.20	6.78 ± 0.32	7.26e-03
	3.49	Glucosa	1.46 ± 0.14	8.11 ± 0.20	7.58e-03
	3.51	Glucosa	2.44 ± 0.29	10.07 ± 0.38	5.51e-03
	3.55	Glucosa	1.86 ± 0.18	3.99 ± 0.19	3.18e-03
	3.56	Glucosa	2.26 ± 0.31	4.66 ± 0.31	4.93e-03
	3.84	Glucosa	1.75 ± 0.15	5.23 ± 0.19	6.15e-03
	3.96	Glucosa	2.63 ± 0.30	7.01 ± 0.30	2.05e-03
	4.12	Lactato	1.32 ± 0.09	3.04 ± 0.12	2.99e-03
	4.14	Lactato	2.37 ± 0.15	9.48 ± 0.31	1.21e-03
	4.15	Lactato	2.48 ± 0.18	9.73 ± 0.28	1.06e-03
	4.16	Lactato	0.96 ± 0.01	3.74 ± 0.22	9.96e-04
	4.17	Ac. Hidroxibutírico	0.93 ± 0.01	3.57 ± 0.08	2.73e-03
	4.18	Ac. Hidroxibutírico	0.56 ± 0.01	1.83 ± 0.07	3.74e-04
	4.69	Glucosa	2.38 ± 0.59	7.37 ± 0.12	5.60e-03
	5.25	Glucosa	1.31 ± 0.28	4.42 ± 0.19	5.84e-03

Tabla 6.3: Sumario de los metabolitos postulados para las regiones significativas destacadas por los PCAs, con las intensidades relativas medias (media ± SD) de los dos grupos y su significancia (p-value).

EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA MEDIANTE PLS-DA

Usando los desplazamientos químicos seleccionados con anterioridad para cada tipo de muestra, se construyeron dos modelos diagnósticos PLS-DA entrenados con 7 muestras control y 5 VILI, siendo validados con otras 7 muestras control y 5 ratas VILI. Tres componentes PLS fueron seleccionadas para construir el modelo obteniendo un éxito de clasificación del 100%.

CORRELACIÓN ENTRE LA INTENSIDAD METABÓLICA Y LOS PARÁMETROS DE DAÑO PULMONAR

Los resultados de este análisis prueban la interrelación entre la intensidad metabólica y los indicadores de daño pulmonar severo. En concreto, todos los metabolitos seleccionados mediante los PCAs se presentan directamente asociados con los valores de PIP ($R^2=0.90$, p-value=0.0001) (figura 6.11), PaO_2 ($R^2=0.60$, p-value=0.01) (figura 6.12) y resultados histológicos del daño pulmonar (LIS) ($R^2=0.76$, p-value=0.0001) (figura 6.13). La asociación de cada metabolito con los valores de PIP, PaO_2 y LIS están recogidas en la tabla 6.4. El metabolito que presenta una mejor correlación con los indicadores de daño pulmonar es la creatina (figuras 6.15, 6.16 y 6.17).

Metabolito		PIP		PaO ₂		LIS	
		R ²	p value	R ²	p value	R ²	p value
Pulmón	Glucosa	0.73	0.001	0.34	0.01	0.65	0.001
	Lactato	0.56	0.01	0.32	0.01	0.39	0.01
	Glicina	0.48	0.01	0.33	0.04	0.52	0.01
BAL	Glucosa	0.92	0.001	0.63	0.001	0.77	0.001
	Lactato	0.81	0.001	0.55	0.001	0.60	0.001
	Creatina	0.89	0.001	0.72	0.001	0.79	0.001
	Ac.Hidroxibutírico	0.64	0.001	0.31	0.04	0.35	0.01
	Acetato	0.65	0.001	0.24	0.04	0.28	0.04

Tabla 6.4: Correlación entre la intensidad metabólica y los parámetros de daño pulmonar.

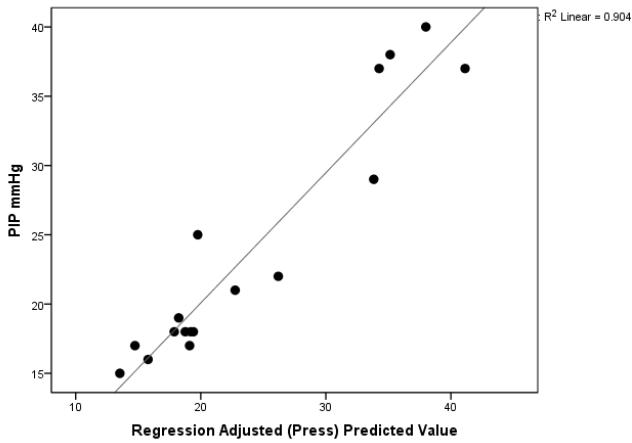


Figura 6.11: Correlación entre la intensidad metabólica y el valor pico de presión inspiratoria (PIP) a 150m.

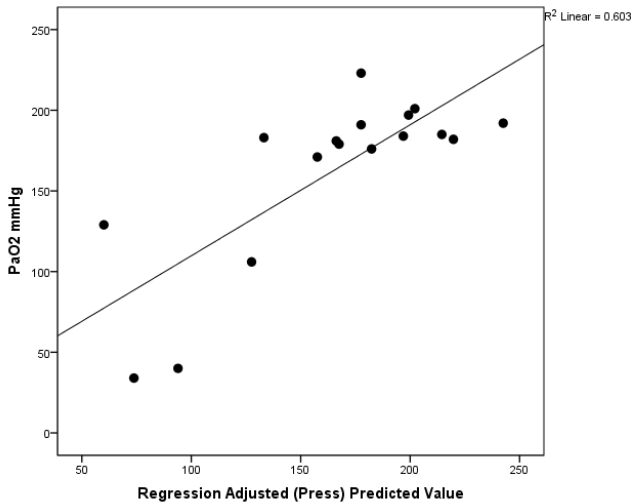


Figura 6.12: Correlación entre la intensidad metabólica y el valor de la presión de oxígeno arterial (PaO₂) a 150m.

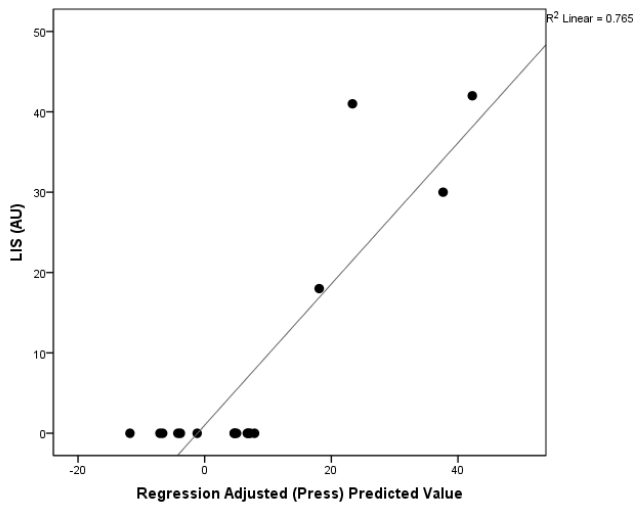


Figura 6.13: Correlación entre la intensidad metabólica y el resultado histológico del daño pulmonar (LIS).

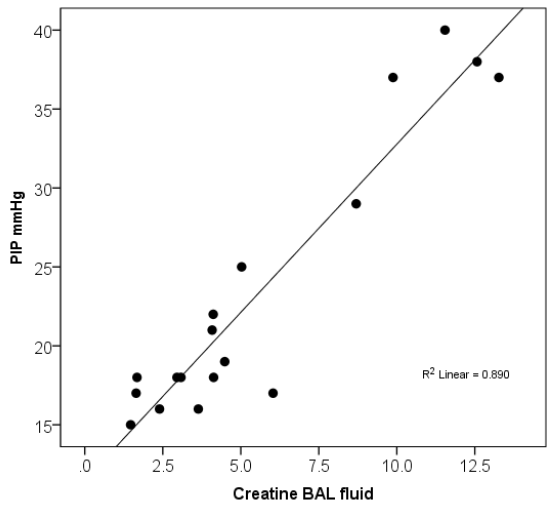


Figura 6.14: Correlación entre la intensidad de la creatina y el valor pico de presión inspiratoria (PIP) a 150m.

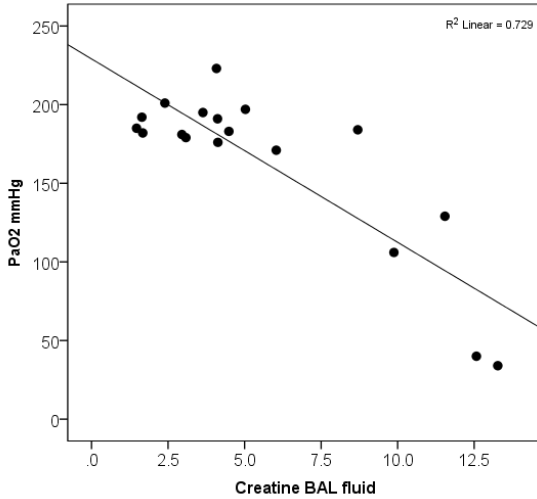


Figura 6.15: Correlación entre la intensidad de la creatina y el valor de la presión de oxígeno arterial (PaO₂) a 150m.

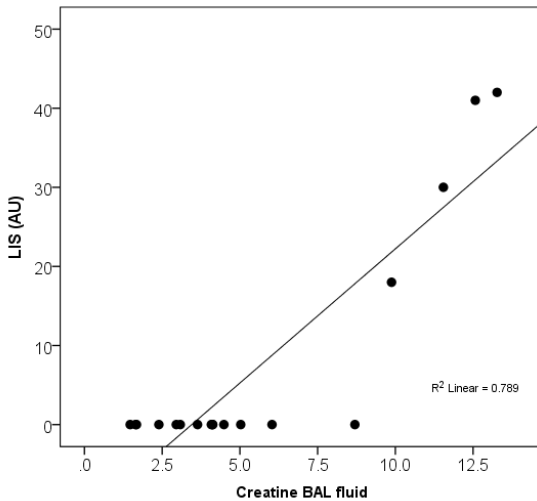


Figura 6.16: Correlación entre la intensidad de la creatina y el resultado histológico del daño pulmonar (LIS).

4. Conclusiones.

En este estudio pionero describimos como la concentración de unos determinados metabolitos se ve alterada significativamente en muestras de tejido pulmonar y fluido BAL al exponer a un grupo de ratas a una estrategia de ventilación mecánica con un alto valor de V_T .

La importancia de este estudio radica en que el diagnóstico precoz del VILI se ha convertido en un aspecto crucial en el tratamiento de la enfermedad. En los últimos años se han venido produciendo remarcables esfuerzos en encontrar expresiones moleculares distintivas durante el VILI en consonancia de desarrollar una aproximación eficiente para la diagnosis precoz y pronosis de la enfermedad [7]. A pesar de que varias proteínas del plasma han sido propuestas como biomarcadores diagnósticos [8], estas no presentaban la suficiente sensibilidad y especificidad. En este contexto, hemos desarrollado una aproximación metabonómica a través de la espectroscopía de RMN para la diagnosis del VILI.

El análisis metabonómico no solamente se muestra como una herramienta diagnóstica. El estudio del perfil metabólico del VILI nos proporciona un mejor entendimiento de los cambios bioquímicos y patofisiológicos que se producen en el desarrollo del daño pulmonar agudo. Los incrementos en las concentraciones de lactato, glucosa y creatina en las muestras de tejido pulmonar y fluido BAL de las ratas con VILI resultan esperables por una serie de factores:

Primeramente, el incremento de los niveles de glucosa, lactato y creatina indica alteraciones en las rutas energéticas celulares [9]. La inflamación pulmonar debido al VILI, alterará las asociaciones metabólicas relacionadas con la ruta energética celular necesaria para mantener los requerimientos energéticos de la contracción y expansión pulmonar. En segundo lugar, el daño pulmonar agudo producirá una disminución en el intercambio de gases provocando una hipoxia global en el tejido, conduciendo a un estado de hiperlactatemia. En general, los niveles de lactato pueden indicar el grado del trastorno celular, y la duración de la acidosis láctica suele acarrear un mal pronóstico en el tratamiento clínico. La razón del incremento del lactato es compleja [10], en parte resultado de la

hipoxia tisular [11]. En presencia de una fuente de oxígeno insuficiente, el piruvato es convertido de una manera desproporcionada en lactato en vez de entrar en la ruta del ciclo de Krebs. En un trabajo reciente sobre el daño pulmonar, Serkova et al. [12] encontraron que el estado energético de los pulmones inflamados se encontraba disminuido (marcado por el agotamiento del ATP y balance energético) con un incremento significativo de la actividad glicolítica (ratios lactato-glucosa elevados). En la misma línea, Mao et al. [13] mostraron a través de una aproximación metabonomía por RMN que los niveles de lactatos podían usarse para la correcta clasificación de pacientes con síndrome de disfunción orgánica múltiple. Otro estudio presentado por Stringer et al. [14] revelaba diferencias en los metabolitos relacionados con el estrés oxidativo, homeostasis energética, apoptosis y función de la barrera endotelial incluyendo la glucosa, entre pacientes con daño pulmonar agudo y sujetos sanos. Nuestros resultados son consistentes con un proceso inflamatorio agudo que causa daño en las células pulmonares, incrementando los niveles de lactato y creatina [15, 16].

El ácido hidroxibutírico es un cuerpo cetónico producto de la cetosis, sintetizado en el hígado por la acetil coenzima A que puede ser usado como fuente de energía cuando los niveles de glucosa son muy bajos. En el pulmón, el ácido hidroxibutírico, como la glucosa y el lactato, sirve de precursor para la síntesis de fosfolípidos pulmonares. Los lípidos sintetizados, particularmente la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), son incorporados al surfactante, y por ello el ácido hidroxibutírico tiene un papel potencial en el suplemento adecuado de lípidos para mantener la función pulmonar [17]. Un incremento del ácido hidroxibutírico estaría relacionado con un aumento de la oxidación de ácidos grasos en las ratas con VILI. Como la mayor fuente de energía del organismo, la oxidación de ácidos grasos aumenta significativamente para cubrir los requerimientos energéticos [18], produciéndose una acumulación de los cuerpos cetónicos, productos finales del proceso oxidativo.

La glicina es un aminoácido sintetizado por el cuerpo desde el aminoácido serina, y ejerce como precursor de proteínas. Su actuación en estados de respuesta inflamatoria está basada en los procesos de destrucción proteica y rhabdomiólisis. Nuestro estudio muestra como los niveles de glicina disminuyen significativamente en los pulmones de las ratas con daño pulmonar respecto a los animales control. Al ser la glicina un

metabolito colágeno [19, 20], estos resultados indican una alteración en la vía del colágeno en las ratas con VILI.

Resumiendo, el estudio presentado muestra un cambio metabólico en las muestras de tejido pulmonar y del fluido BAL en las ratas sometidas a un daño pulmonar por ventilación mecánica, claramente mostrado a través de los PCAs y validado por el 100% de aciertos en los modelos predictivos desarrollados. Los niveles de glucosa, lactato, acetato y creatina se encuentran significativamente incrementados en las ratas VILI sugiriendo un daño en la vía energética celular. El incremento del ácido hidroxibutírico sugiere alteraciones en el metabolismo lipídico y en la producción del surfactante pulmonar. Los bajos niveles de glicina están relacionados con la vía del colágeno, proceso que conduce a la cicatrización pulmonar. Basándonos en lo anteriormente expuesto, creemos demostrado que las vías celulares energética, lipídica y colágena se muestran alteradas en la inflamación pulmonar producida por el VILI.

5. Referencias.

1. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2000; 284(1): 43-44.
2. Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A, Wiedemann HP, Arroliga AC, Fisher CJ, Komara JJ, Perez-Trepichio P, Parsons PE, Wolkin R, Welsh C, Fulkerson WJ, MacIntyre N, Mallatrat L, Sebastian M, McConnell R, Wilcox C, Govert J, Thompson D, Clemmer T, Davis R, Orme J, Weaver L, Grissom C, Eskelson M, Young M, Gooder V, McBride K, Lawton C, d'Hulst J, Peerless JR, Smith C, Brownlee J, Pluss W, Kallet R, Luce JM, Gottlieb J, Elmer M, Girod A, Park P, Daniel B, Gropper M, Abraham E, Piedalue F, Glodowski J, Lockrem J, McIntyre R, Reid K, Stevens C, Kalous D, Silverman HJ, Shanholtz C, Corral W, Toews GB, Arnoldi D, Bartlett RH, Dechert R, Watts C, Lanken PN, Anderson H, Finkel B, Hanson CW, Barton R, Mone M, Hudson LD, Lee C, Carter G, Maier RV, Steinberg KP, Bernard G, Stroud M, Swindell B, Stone L, Collins L, Mogan S, Ancukiewicz M, Hayden D, Molay F, Ringwood N, Wenzlow G, Kazeroonian AS, Gail DB, Bosken CH, Randall P, Waclawiw M, Spragg RG, Boyett J, Kelley J, Leeper K, Secundy MG, Slutsky A, Hyers TM, Emerson SS, Garcia JGN, Marini JJ, Pingleton SK, Shasby MD, Sibbald WJ, Netwo ARDS. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine* 2000; 342(18): 1301-1308.
3. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R, Dhainaut JF, Matthay M, Mancebo J, Meyrick B, Payen D, Perret C, Fowler AA, Schaller MD, Vanasbeck BS, Cochin B, Lanken PN, Leeper KV, Marini J, Murray JF, Oppenheimer L, Pesenti A, Reid L, Rinaldo J, Villar J. Report of the american-european consensus conference on ards - definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical-trial coordination. *Intensive Care Medicine* 1994; 20(3): 225-232.

4. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis (vol 39, pg 206, 2004). *Clinical Infectious Diseases* 2005; 40(9): 1386-1388.
5. Xi Y, Rocke DM. Baseline correction for NMR spectroscopic metabolomics data analysis. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 324.
6. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, Hau DD, Psychogios N, Dong E, Bouatra S, Mandal R, Sinelnikov I, Xia J, Jia L, Cruz JA, Lim E, Sobsey CA, Shrivastava S, Huang P, Liu P, Fang L, Peng J, Fradette R, Cheng D, Tzur D, Clements M, Lewis A, De Souza A, Zuniga A, Dawe M, Xiong Y, Clive D, Greiner R, Nazzyrova A, Shaykhutdinov R, Li L, Vogel HJ, Forsythe I. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(Database issue): D603-610.
7. Villar J, Blanco J, Kacmarek RM. Acute respiratory distress syndrome definition: do we need a change? *Current Opinion in Critical Care* 2011; 17(1): 13-17.
8. Calfee CS, Ware LB, Glidden DV, Eisner MD, Parsons PE, Thompson BT, Matthay MA. Use of risk reclassification with multiple biomarkers improves mortality prediction in acute lung injury. *Crit Care Med*.
9. Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J. Cell biology. 2nd ed. Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2008.
10. Jue T. Bioenergetics implication of metabolic fluctuation during muscle contraction. In: Shulman R, Rothman D, eds. *Metabolomics by In Vivo NMR*. John Wiley & Sons, 2005; pp. 104-123.
11. Meyerspeer M, Kemp GJ, Mlynárik V, Krššák M, Szendroedi J, Nowotny P, Roden M, Moser E. Direct noninvasive quantification of lactate and high energy phosphates simultaneously in exercising human skeletal muscle by localized magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 2007; 57(4): 654-660.

12. Serkova NJ, Van Rheen Z, Tobias M, Pitzer JE, Wilkinson JE, Stringer KA. Utility of magnetic resonance imaging and nuclear magnetic resonance-based metabolomics for quantification of inflammatory lung injury. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 2008; 295(1): L152-L161.

13. Mao H, Wang H, Wang B, Liu X, Gao H, Xu M, Zhao H, Deng X, Lin D. Systemic Metabolic Changes of Traumatic Critically Ill Patients Revealed by an NMR-Based Metabonomic Approach. *J Proteome Res* 2009; 8(12): 5423-5430.

14. Stringer KA, Serkova NJ, Karnovsky A, Guire K, Paine R, Standiford TJ. Metabolic consequences of sepsis-induced acute lung injury revealed by plasma ¹H-nuclear magnetic resonance quantitative metabolomics and computational analysis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*; 300(1): L4-L11.

15. Haji-Michael PG, Ladriere L, Sener A, Vincent JL, Malaisse WJ. Leukocyte glycolysis and lactate output in animal sepsis and ex vivo human blood. *Metabolism-Clinical and Experimental* 1999; 48(6): 779-785.

16. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS. HIF-1 alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation (vol 112, pg 648, 2003). *Cell* 2003; 113(3): 419-419.

17. Sheehan PM, Yeh YY. Pulmonary Surfactant Lipid-Synthesis from Ketone-Bodies, Lactate and Glucose in Newborn Rats. *Lipids* 1985; 20(12): 835-841.

18. Kuo CD, Wu WG, Wang JH, Chen SM, Chiang BN. Proton Nuclear Magnetic-Resonance Studies of Plasma to Determine Metabolic Status of Patients with Adult Respiratory-Distress Syndrome. *Clin Chem* 1989; 35(4): 667-670.

19. Schiller J, Naji L, Huster D, Kaufmann J, Arnold K. H-1 and C-13 HR-MAS NMR investigations on native and enzymatically digested bovine nasal cartilage. *Magn Reson Mat Phys Biol Med* 2001; 13(1): 19-27.

20. Keshari KR, Lotz JC, Kurhanewicz J, Majumdar S. Correlation of HR-MAS spectroscopy derived metabolite concentrations with collagen and proteoglycan levels and Thompson grade in the degenerative disc. *Spine* 2005; 30(23): 2683-2688.

Capítulo 7

Resumen y Conclusiones

En la presente Tesis Doctoral se propuso una aproximación metabonómica para el estudio y diagnóstico de enfermedades respiratorias. La temática del proyecto ha requerido durante estos años de un aprendizaje y formación especial del doctorando en aspectos bioquímicos y médicos, aprovechando para ello la relación directa con grupos de investigación de referencia en estos campos así como la visita a centros de investigación pioneros en el campo de la metabonómica. De esta forma, se efectuó una estancia de tres meses en el grupo del Dr. Nicholson del Imperial College de Londres, centro líder en el análisis metabonómico, donde el doctorando recibió la formación específica del análisis metabonómico por espectroscopía de masas y se realizaron los experimentos correspondientes al capítulo 4. Además, hay otros aspectos técnicos que también han sido desarrollados por el doctorando relacionados con el seguimiento de la respuesta metabólica a través de la Imagen de Resonancia Magnética, en concreto mediante Imágenes de Transferencia de Saturación de Intercambio Químico (Chemical Exchange Saturation Transfer, CEST) e imágenes de protón y de gases polarizados, que no han sido expuestos en esta memoria al no estar directamente relacionados con el análisis metabonómico.

La elección de las enfermedades respiratorias descritas en esta memoria, EPOC y daño pulmonar agudo, surge por la necesidad de crear herramientas diagnósticas específicas que permitan el tratamiento precoz de estas dolencias. Los métodos diagnósticos actuales de estas enfermedades se basan en criterios no específicos (radiodiagnóstico, espirometría, cuadro clínico, etc.) que únicamente permiten su detección en la fase aguda de la enfermedad. De esta forma, la detección de biomarcadores moleculares que permitan la identificación de la respuesta bioquímica del organismo en los primeros estadios de la enfermedad es hoy en día uno de los objetivos primordiales en el campo de la biomedicina,

donde el análisis metabólico surge como una aproximación idónea para esta tarea.

Como se ha comentado, el análisis e interpretación de los perfiles metabólicos es una labor compleja que requiere de múltiples etapas. El diseño del paquete “Metabonomic” ha permitido un análisis integral de los datos espectrales de los estudios llevados a cabo en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Así mismo, al ser desarrollado dentro de la plataforma de código abierto R, el paquete se encuentra disponible para la libre utilización del mismo, tanto por usuarios noveles, como por usuarios avanzados.

Los estudios animales realizados nos han confirmado la existencia de un perfil metabonómico específico de las enfermedades estudiadas, directamente detectable a través del análisis espectroscópico del propio tejido pulmonar, como a través de muestras indirectas como son el fluido del lavado bronqueoalveolar, el fluido del condensado del exhalado pulmonar o el suero sanguíneo. Estos análisis permitieron la identificación de biomarcadores metabólicos de la EPOC en un modelo por humo de tabaco en ratón (capítulo 3), así como biomarcadores de daño pulmonar por sepsis (capítulo 5) y por ventilación mecánica (capítulo 6) en ratas. Los biomarcadores detectados nos permitieron el estudio de las características patofisiológicas de las enfermedades analizadas y el desarrollo de modelos predictivos de las mismas, remarcando la intención traslacional de nuestros estudios. De esta forma se incluye en la memoria un estudio pionero para la detección de la EPOC clínica a través del análisis metabonómico por espectroscopía de masas de muestras de condensado del exhalado respiratorio humano (capítulo 4). En la misma línea de actuación, actualmente se encuentran en fase de desarrollo estudios clínicos en humanos del distrés respiratorio por gripe H1N1, sepsis en pacientes de unidades de cuidados intensivos y pacientes con fallo renal.

Es pertinente destacar en este resumen, que los méritos de esta tesis no se quedan localizados en los análisis espectroscópicos y en el desarrollo de métodos bioinformáticos. Durante el desarrollo de los estudios presentados se han optimizado los protocolos experimentales, incluyendo preparación y adquisición de muestras y protocolos de adquisición espectroscópica. Esto ha dado lugar a cuestionar los protocolos establecidos y considerar probados algunos errores cometidos en estudios previos como se describe en el capítulo 4.

Para finalizar, nos permitimos enumerar de manera que sean fácilmente identificables los resultados y conclusiones más importantes de esta tesis:

1. Se ha desarrollado el paquete “Metabonomic” para el análisis e interpretación de los perfiles metabólicos en la plataforma para el análisis estadístico R, incluyendo procesamiento de los espectros de RMN, procesamiento de la matriz espectral, análisis multivariantes no supervisados y finalmente análisis discriminantes supervisados.
2. Fue probado con éxito la validez del análisis metabonómico como herramienta diagnóstica precoz de la EPOC en un modelo de exposición al humo del tabaco en ratones. Los resultados mostraron que las intensidades de las señales de 6 metabolitos característicos (glutatión, glicerofosfolina, fosfolina, taurina e isoleucina) permitían discriminar entre muestras control y agudamente expuestas al humo del tabaco con un éxito superior al 70% para las cepas de ratones susceptibles de desarrollar enfisema. Por el contrario, las señales seleccionadas fallaban al intentar clasificar las muestras de las cepas resistentes a la enfermedad, con un porcentaje de éxito en la clasificación de alrededor del 60% con una desviación estándar del 15%. Así mismo, los modelos predictivos sobre muestras crónicamente expuestas al humo del tabaco, donde la presencia de la EPOC es confirmada por microscopía, mostraron un porcentaje de éxito en la clasificación del 100%. Los metabolitos identificados como biomarcadores están relacionados de forma directa con el proceso de estrés oxidativo producido por la inhalación del humo del tabaco.
3. Se ha propuesto la aproximación metabonómica mediante RMN como herramienta válida para el diagnóstico de la sepsis. La concentración de ciertos metabolitos endógenos, entre los que se encuentran la alanina, creatina, fosfoetanolamina, mioinositol y el formato, cambió significativamente en las muestras de tejido pulmonar, fluido BAL y suero de ratas con sepsis motivado por los requerimientos energéticos del organismo en un estado de shock. El modelo diagnóstico de sepsis desarrollado usando una

combinación de diferentes muestras biológicas obtuvo un éxito de clasificación del 100%.

4. Se detectó el cambio metabólico en las ratas sometidas a un daño pulmonar por ventilación mecánica a través del análisis de las muestras de tejido pulmonar y del fluido BAL. Los niveles de glucosa, lactato, acetato y creatina se encontraban significativamente incrementados en las ratas VILI respecto a las control, sugiriendo un daño en la vía energética celular. Así mismo se detectó un incremento en la concentración del ácido hidroxibutírico, sugiriendo alteraciones en el metabolismo lipídico y en la producción del surfactante pulmonar, y una disminución en la concentración de glicina, relacionado con la cicatrización pulmonar. Basándonos en lo anteriormente expuesto, creemos demostrado que las vías energética celular, lipídica y colágena se muestran alteradas en la inflamación pulmonar producida por el VILI. El modelo predictivo obtuvo un éxito de clasificación del 100%
5. Se demostró la capacidad del análisis metabonómico de las muestras de condensado del exhalado respiratorio por masas como herramienta diagnóstica del EPOC clínico en humanos. Así mismo creemos probado que los protocolos de limpieza de las partes reusables de los dispositivos condensadores de exhalados respiratorios producen un perfil metabólico artificial no relacionado con la señal metabólica endógena de los pulmones. Y finalmente se propuso el análisis metabonómico por UPLC-MS y el uso de dispositivos no reutilizables como un estándar del análisis metabonómico de muestras de EBC.

Glosario

AIA:	Área Interna Alveolar.
ALI:	Daño pulmonar agudo.
ALT:	Alanina Aminotransferasa.
AST:	Aspartato Aminotransferasa.
BAL:	Lavado Bronqueo-Alveolar.
CK:	Creatinkinasa.
C _{RS} :	Compliance Dinámica del Sistema Respiratorio.
D ₂ O:	Agua Deuterada.
EBC:	Condensado del Exhalado Respiratorio.
EPOC:	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
FID:	Señal de Precesión Libre.
FTIR:	Transformada Fourier de Espectroscopía Infrarroja.
GSH:	Glutación.
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
HR-MAS:	Espectroscopía de Alta Resolución por Giro de Ángulo Mágico.
KNN:	Análisis por Vecinos Cercanos.
LC:	Cromatografía Líquida.
LDA:	Análisis Lineal Discriminante.
LDH:	Concentración de Urea en Suero.
LM:	Cuerda Alveolar.
MAP:	Presión Media Arterial.
MS:	Espectroscopía de Masas.

OPLS:	Proyecciones Ortogonales de Estructuras Latentes.
PaO ₂ :	Presión de Oxígeno Arterial.
P _{aw} :	Pico de presión de la vía aérea.
PCA:	Análisis de Componentes Principales.
PEEP:	Presión Positiva Teleespiratoria.
PIP:	Pico de Presión Inspiratoria.
PLS:	Mínimos Cuadrados Parciales.
PLS-DA:	Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales.
Q _{AO} :	Flujo aórtico medio.
Q-TOF:	Cuadrapolo-Tiempo de Vuelo.
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear.
RMSEP:	Raíz Media del Error Estándar de Predicción.
RNA:	Red Neuronal Artificial.
SDR:	Síndrome de Distrés Respiratorio.
SEP:	Error Estándar de Predicción.
TOF:	Tiempo de Vuelo.
TSP:	Ácido Trimetilsilil-Propiónico.
UCI:	Unidad de Cuidados Intensivos.
UPLC:	Cromatografía Líquida de Ultra-alta Resolución.
VILI:	Daño pulmonar inducido por ventilación mecánica.
V _T :	Volumen Tidal.

Índice de tablas

2.1. Paquetes necesarios para ejecutar el programa “Metabonomic”	23
2.2. Ejemplo de archivo de datos con la información espectral para ser importado por el programa “Metabonomic”	25
2.3. Ejemplo de archivo de información para ser importado por el programa “Metabonomic”	26
3.1. Cepas murinas utilizadas en el estudio	48
3.2. Resultado de los análisis estadísticos F enfrentando muestras control con muestras tratadas para cepas susceptibles y resistentes al EPOC.	52
3.3. Cambios morfométricos (AIA and LM) estimados mediante tinte de hematoxilina-eosina en el modelo crónico	55
3.4. Asignación e intensidades relativas de los desplazamientos químicos seleccionados para construir del modelo crónico de ratón AKR/J	58
3.5. Éxito de predicción entre ratones expuestos al humo del tabaco y ratones control de los modelos PLS-DA desarrollados	59
5.1. Resultados hemodinámicos, gases en sangre y variables bioquímicas en animales septicémicos y control.	90
5.2. Sumario de los metabolitos postulados como biomarcadores de la sepsis.....	101
5.3. Resultados de clasificación de las ratas septicémicas usando los diferentes modelos predictivos.....	102
6.1. Resultados hemodinámicos, gases en sangre y variables bioquímicas en animales control y con VILI	116
6.2. Variables bioquímicas y resultados del daño pulmonar de los grupos control y VILI	117

6.3. Sumario de los metabolitos postulados para las regiones significativas destacadas por los PCAs, con las intensidades relativas medias de los grupos VIII y control y su significancia estadística	127
6.4. Correlación entre la intensidad metabólica y los parámetros de daño pulmonar	128

Índice de figuras

1.1. Diagrama de flujo del análisis metabonómico.	4
1.2. Estados de energía del espín nuclear 1/2	6
1.3. Movimiento de precesión del espín nuclear	7
1.4. Representación de las dos primeras componentes principales en un espacio tridimensional	14
1.5. Representación de la primera variable latente del modelo PLS componentes elegida para maximizar la correlación entre la matriz X e Y	16
2.1. Interfaz gráfico del paquete “Metabonomic”.	24
2.2. Interfaz gráfica interactiva para el ajuste de la fase y referencia del desplazamiento químico a una señal conocida.....	28
2.3. Corrección de la línea base del espectro de ^1H RMN mediante el paquete “Metabonomic”	30
2.4. Comparación de los dos métodos principales para la corrección del desplazamiento de señales.	32
2.5. Aplicación gráfica interactiva para el Análisis de Componentes Principales	35
2.6. Aplicación gráfica interactiva para el Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales	37
3.1. Diagrama de la selección de las áreas espectrales significativas relacionadas al progreso de la enfermedad.....	54
3.2. Imágenes microscópicas mediante tinte de hematoxilina-eosina (10x) del modelo crónico de ratón.....	56
3.3. Sección alifática del espectro de protón característico de animales fumadores	57

3.4. Espectro bidimensional COSY sobre el que se han asignado los picos cruzados de los metabolitos seleccionados para construir el modelo predictivo	58
3.5. Regresión R2 y porcentaje de la varianza explicada de los modelos PLS	60
4.1. Diagrama esquemático del dispositivo de condensado del exhalado respiratorio e imagen del proceso de recogida del EBC de un sujeto control.	70
4.2. Regiones seleccionadas del espectro de 1H del desinfectante utilizado en el proceso de limpieza y del espectro de 1H de EBC de un sujeto control	72
4.3. Espectros 1H-RMN de EBC utilizando diferentes protocolos de limpieza	73
4.4. Espectro 1H-RMN de EBC (A) con el mismo procedimiento de recolección de muestra y desinfección que el publicado por Laurentiis (B)	74
4.5. Espectro 1H-RMN de EBC proveniente de un sujeto control y espectro 1H-RMN de la condensación del aire ambiental introducido en el condensador por un dispositivo de ventilación continua	75
4.6. Matriz de masa tridimensional UPLC-TOF de una muestra EBC de un sujeto control y de un paciente con EPOC, adquiridos usando un dispositivo no reusable	78
4.7. PCA y PLS de los datos espectrales de masas UPLC-TOF de muestras EBC	80
5.1. Gráfica de scores del PCA de los espectros 1H RMN de tejido pulmonar	91
5.2. Gráfica de scores del PCA de los espectros 1H RMN de fluido BAL.	92
5.3. Gráfica de scores del PCA de los espectros 1H RMN de suero sanguíneo	93
5.4. Gráfica de loadings del PCA de los espectros 1H RMN de tejido pulmonar	94

5.5. Gráfica de loadings del PCA de los espectros 1H RMN de fluido BAL ...	95
5.6. Gráfica de loadings del PCA de los espectros 1H RMN de suero	96
5.7. Análisis de coeficientes de regresión PLS de los espectros 1H RMN de suero.....	97
5.8. Espectro 1H RMN representativo de suero, BAL y tejido pulmonar de ratas septicémicas	98
5.9. Espectros bidimensionales: Espectro TOCSY del tejido pulmonar y COSY del fluido BAL	99
5.10. Espectros bidimensionales: Espectro COSY y HSQC de suero sanguíneo	100
6.1. Fotografía microscópica de los cortes de pulmón de los grupos control y VILI.....	118
6.2. Gráfica de scores del PCA de los espectros 1H RMN de tejido pulmonar de los grupos control y VILI	119
6.3. Gráfica de scores del PCA de los espectros 1H RMN de fluido BAL de los grupos control y VILI	120
6.4. Gráfica de loadings del PCA de los espectros 1H RMN de tejido pulmonar de los grupos control y VILI	121
6.5. Gráfica de loadings del PCA de los espectros 1H RMN de fluido BAL de los grupos control y VILI	122
6.6. Análisis de coeficientes de regresión PLS de los espectros 1H RMN de suero de los grupos control y VILI	123
6.7. Espectros 1H RMN representativo de muestras de tejido pulmonar de ratas con VILI y control	124
6.8. Espectros 1H RMN representativo de muestras de fluido BAL de ratas con VILI y control.....	124
6.9. Espectro bidimensional COSY representativo del tejido pulmonar destacando las asignaciones metabólicas cruzadas.....	125
6.10. Espectro bidimensional COSY representativo del fluido BAL destacando las asignaciones metabólicas cruzadas.....	126

6.11. Correlación entre la intensidad metabólica y el valor de PIP a 150m	129
6.12. Correlación entre la intensidad metabólica y el valor de PaO ₂ a 150m	129
6.13. Correlación entre la intensidad metabólica y el resultado histológico del daño pulmonar.....	130
6.14. Correlación entre la intensidad de la creatina y el valor de PIP a 150m	130
6.15. Correlación entre la intensidad de la creatina y el valor de PaO ₂ a 150m	131
6.16. Correlación entre la intensidad de la creatina y el resultado histológico del daño pulmonar.....	131

Lista de publicaciones

- **A novel R-package GUI for the analysis of metabonomic profiles.** BMC Bioinformatics 2009, 10:363
- **A metabonomic approach to evaluate COPD in a model of cigarette smoke exposure in mice.** Metabolomics 2010, 6:564–573.
- **Is the NMR-based metabolomic analysis of Exhaled Breath Condensate accurate?** European Respiratory Journal 2011, 37, 468-470
- **Descriptive review of current NMR-based metabolomic data analysis packages.** Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. (En prensa).
- **A metabolomic approach for the diagnosis of experimental sepsis.** Intensive Care Medicine (En revisión)
- **Metabolomic analysis in an experimental model of ventilator induced lung injury.** (Manuscrito)